(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平８－２７１８９

(43)公開日　平成８年（１９９６）１月３０日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
C07K 14/52		8318-4H		
A61K 38/09	ABH			
	AED			
C12N 1/21		8828-4B		
15/09				

審査請求　未請求　請求項の数２２　ＦＤ　（全１７頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平６－１８４１６２

(22)出願日　平成６年（１９９４）７月１４日

(71)出願人　０００１５５９０８
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井１丁目２番３号

(72)発明者　岡村　春樹
大阪府茨木市中穂積２丁目１２番３２号

(72)発明者　谷本　忠雄
岡山県岡山市山崎３１２番地の８８

(72)発明者　鳥越　角二
岡山県倉敷市藤戸町藤戸１３４３番地の５

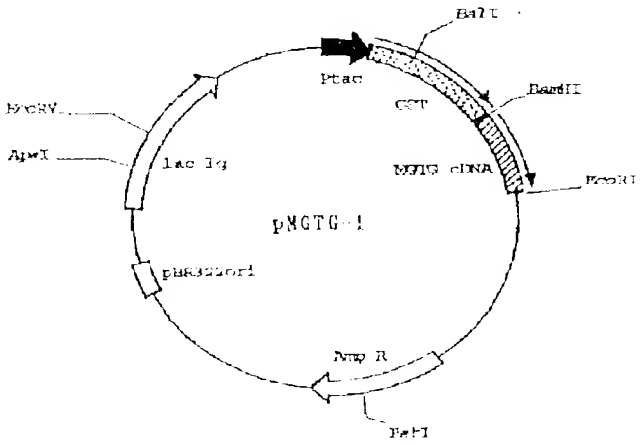
(72)発明者　栗本　雅司
岡山県岡山市学南町２丁目７番２５号

(54)【発明の名称】インターフェロン－γの産生を誘導する蛋白質

(57)【要約】

【目的】　免疫担当細胞においてＩＦＮ－γの産生を誘導する蛋白質、その蛋白質をコードするＤＮＡ、そのＤＮＡを含む組換えＤＮＡ及び形質転換体並びにその形質転換体を用いる蛋白質の製造方法を提供する。

【構成】　特定の理化学的性質を有する蛋白質と、その蛋白質をコードするＤＮＡと、そのＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡと、その組換えＤＮＡを適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養培地で培養し、産生した蛋白質を培養物から採取してなる蛋白質の製造方法を要旨とする。



【特許請求の範囲】

【請求項１】　下記の理化学的性質を有する蛋白質。

（１）　分子量

ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量１９，０００±５，０００ダルトンを示す。

（２）　等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、４．８±１．０に等電点を示す。

（３）　部分アミノ酸配列

配列表における配列番号１及び２に示す部分アミノ酸配列を有する。

（４）　生物作用

免疫担当細胞においてインターフェロン－γの産生を誘導する。

【請求項２】　配列表における配列番号３（ただし、符号「Ｘａａ」はメチオニン又はトレオニンを意味するものとする。）に示すＮ末端からのアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列を有する請求項１に記載の蛋白質。

【請求項３】　請求項１乃至２に記載の蛋白質をコードするＤＮＡ。

【請求項４】　配列表における配列番号４に示す５´末端からの塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項３に記載のＤＮＡ。

【請求項５】　遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号３に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号４に示す塩基配列における塩基の１個又は２個以上を他の塩基で置換した請求項３又は４に記載のＤＮＡ。

【請求項６】　マウスの肝臓に由来する請求項３、４又は５に記載のＤＮＡ。

【請求項７】　請求項１乃至２に記載の蛋白質をコードするＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡ。

【請求項８】　ＤＮＡが配列表における配列番号４に示す５´末端からの塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項７に記載の複製可能な組換えＤＮＡ。

【請求項９】　遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号３に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号４に示す塩基配列における塩基の１個又は２個以上を他の塩基で置換した請求項７又は８に記載の複製可能な組換えＤＮＡ。

【請求項１０】　ベクターがｐＧＥＸ－２Ｔである請求項７、８又は９に記載の複製可能な組換えＤＮＡ。

【請求項１１】　請求項１乃至２に記載の蛋白質をコードするＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項１２】　ＤＮＡが配列表における配列番号４に示す５´末端からの塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項１１に記載の形質転換体。

【請求項１３】　遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号３に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号４に示す塩基配列における塩基の１個又は２個以上を他の塩基で置換した請求項１１又は１２に記載の形質転換体。

【請求項１４】　ベクターがｐＧＥＸ－２Ｔである請求項１１、１２又は１３に記載の形質転換体。

【請求項１５】　宿主が大腸菌である請求項１１、１２、１３又は１４に記載の形質転換体。

【請求項１６】　請求項１乃至２に記載の蛋白質を産生し得る形質転換体を栄養培地で培養し、産生した蛋白質を培養物から採取してなる蛋白質の製造方法。

【請求項１７】　形質転換体が請求項１乃至２に記載の蛋白質をコードするＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡを適宜宿主に導入してなる請求項１６に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項１８】　ＤＮＡが配列表における配列番号４に示す５´末端からの塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項１６又は１７に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項１９】　遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号３に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号４に示す塩基配列における塩基の１個又は２個以上を他の塩基で置換した請求項１６、１７又は１８に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項２０】　ベクターがｐＧＥＸ－２Ｔである請求項１６、１７、１８又は１９に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項２１】　宿主が大腸菌である請求項１６、１７、１８、１９又は２０に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項２２】　産生した蛋白質を濾過、濃縮、塩析、透析、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、等電点電気泳動及びゲル電気泳動から選ばれる１種若しくは２種以上の精製方法により採取する請求項１６、１７、１８、１９、２０又は２１に記載の蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】この発明は、免疫担当細胞においてインターフェロン－γ（以下、「ＩＦＮ－γ」と略記する。）の産生を誘導する新規な蛋白質に関するものである。

【０００２】

【従来の技術】ＩＦＮ－γは、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジェンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると言われている。これら生物作用ゆえに、ＩＦＮ－γはその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が鶴首され、現在では脳腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るＩＦＮ－γは免疫担当細胞が産生する天然型ＩＦＮ－γと、免疫担当細胞から採取したＩＦＮ－γをコードするＤＮＡを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型ＩＦＮ－γに大別され、上記臨床試験においては、これらのうちのいずれかが「外来ＩＦＮ－γ」として投与されている。

【０００３】このうち、天然型ＩＦＮ－γは、通常、株化した免疫担当細胞をＩＦＮ－γ誘導剤を含む培養培地で培養し、その培養物を精製することにより製造される。この方法では、ＩＦＮ－γ誘導剤の種類がＩＦＮ－γの産生量や精製のし易さ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと言われており、通常、コンカナバリンＡ、レンズマメレクチン、アメリカヤマゴボウレクチン、エンドトキシン、リポ多糖などのマイトジェンが使用される。しかしながら、これら物質は、いずれも分子に多様性があり、給源や精製方法に依って品質が変動し易く、誘導能の一定したＩＦＮ－γ誘導剤を所望量入手し難いという問題がある。くわえて、上記物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質によっては毒性を示すものすらあり、生体に直接投与してＩＦＮ－γの産生を誘導するのが極めて困難であった。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、免疫担当細胞においてＩＦＮ－γの産生を誘導する新規な蛋白質を提供することにある。

【０００５】この発明の別の目的は、斯かる蛋白質をコードするＤＮＡを提供することにある。

【０００６】この発明のさらに別の目的は、斯かるＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡを提供することにある。

【０００７】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えＤＮＡを適宜宿主に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【０００８】この発明のさらに別の目的は、組換えＤＮＡ技術を利用した斯かる蛋白質の製造方法を提供することにある。

【０００９】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記第一の課題を、下記の理化学的性質を有する蛋白質により解決するものである。

（１）　分子量
ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量１９，０００±５，０００ダルトンを示す。

（２）　等電点
クロマトフォーカシング法で測定すると、４．８±１．０に等電点を示す。

（３）　部分アミノ酸配列
配列表における配列番号１及び２に示す部分アミノ酸配列を有する。

（４）　生物作用
免疫担当細胞においてＩＦＮ－γの産生を誘導する。

【００１０】この発明は、上記第二の課題を、斯かる蛋白質をコードするＤＮＡにより解決するものである。

【００１１】この発明は、上記第三の課題を、斯かるＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡにより解決するものである。

【００１２】この発明は、上記第四の課題を、斯かるＤＮＡと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えＤＮＡを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【００１３】この発明は、上記第五の課題を、当該蛋白質を産生し得る形質転換体を栄養培地で培養し、産生した蛋白質を培養物から採取してなる蛋白質の製造方法により解決するものである。

【００１４】

【作用】この発明の蛋白質は、既述したとおり、従来公知の蛋白質には見られない独特の理化学的性質を具備しており、免疫担当細胞に作用させると、ＩＦＮ－γの産生を誘導する。

【００１５】この発明のＤＮＡは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えＤＮＡとし、この組換えＤＮＡを、本来、当該蛋白質を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該蛋白質の産生を発現する。

【００１６】この発明の複製可能な組換えＤＮＡは、本来、当該蛋白質を産生しないけれども、容易に増殖させることのできる宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該蛋白質の産生を発現する。

【００１７】この発明の形質転換体は、培養すると、当該蛋白質を産生する。

【００１８】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量の蛋白質が比較的容易に得られる。

【００１９】以下、実施例、実験例等に基づきこの発明を説明するに、この発明は、免疫担当細胞においてＩＦＮ－γの産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。本発明者が、哺乳類由来の細胞が産生するサイトカイン類につき研究していたところ、マウスの肝臓中にＩＦＮ－γの産生を誘導する従来未知の全く新規な物質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの物質を単離し、その性質・性状を調べたところ、その本質は蛋

白質であり、次のような理化学的性質を有するものであることが判明した。

（1）　分子量

SDS−ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法で測定すると、分子量19，000±5，000ダルトンを示す。

（2）　等電点

クロマトフォーカシング法で測定すると、4．8±1．0に等電点を示す

（3）　部分アミノ酸配列

配列表における配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列を有する

（4）　生物作用

免疫担当細胞においてIFN−γの産生を誘導する。

【0020】次に、これら理化学的性質を解明するに到った一連の実験について説明する。

【0021】

【実施例1　精製蛋白質の調製】8週齢の雌CD−1マウス600匹の腹腔内にコリネバクテリウム・パルバム（ATCC 11827）を60℃で1時間加熱して調製した死菌体を1mg／匹注射投与し、通常一般の方法で7日間飼育後、静脈内に大腸菌由来の精製リポ多糖1μg／匹注射投与した。1乃至2時間後、頸椎を脱臼させてマウスを屠殺し、心臓採血後、肝臓を摘出し、8倍容の50mM燐酸緩衝液（pH7．3）中、ホモゲナイザーにより破砕して抽出した。抽出物を約8，000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清約9lに飽和硫酸アンモニウムを含む50mM燐酸緩衝液（pH7．3）を硫酸アンモニウムが45％飽和になるように加え、4℃で18時間静置後、約8，000rpmで30分間遠心分離して当該蛋白質を含む上清約19lを得た。

【0022】この上清を予め1M硫酸アンモニウムを含む10mM燐酸緩衝液（pH7．3）で平衡化させておいたファルマシア製『フェニルセファロース』約1．6lのカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1Mから0．2Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、5mM燐酸緩衝液（pH7．3）をSV0．57で通液した。硫酸アンモニウム濃度が0．8M付近のときに溶出した当該蛋白質を含む画分約4．8lを採取し、膜濃縮し、20mM燐酸緩衝液（pH6．5）に対して4℃で18時間透析後、予め20mM燐酸緩衝液（pH6．5）で平衡化させておいたファルマシア製『DEAE−セファロース』約250mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0．2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに20mM燐酸緩衝液（pH6．5）をSV1．2で通液したところ、当該蛋白質が0．13M付近の塩化ナトリウム濃度で溶出した。

【0023】当該蛋白質を含む溶出液約260mlを採取し、濃縮し、25mMビス−トリス緩衝液（pH7．1）に対して4℃で18時間透析後、予め新鮮な同一の緩衝液で平衡化させておいたファルマシア製『Mono P』約24mlのカラムに負荷し、pH7からpH4に下降するpH勾配下、カラムに10％（v/v）ポリバッファー74（pH4．0）を通液したところ、pHが約4．8のときに当該蛋白質が溶出した。当該蛋白質を含む溶出液約23mlを採取し、濃縮し、予め7mM燐酸水素二ナトリウム、3mM燐酸二水素ナトリウム及び139mM塩化ナトリウムからなる混液（pH7．2）で平衡化させておいたファルマシア製『スーパーデックス75』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液を通液してゲル濾過クロマトグラフィーしたところ、分子量19，000ダルトン付近に当該蛋白質が溶出した。当該蛋白質を含む画分を採取し、濃縮して下記の実験例2に供した。収量は、マウス1匹当たり約0．6μgであった。

【0024】

【実験例2　蛋白質の理化学的性質】

【0025】

【実験例2−1　分子量】実施例1で調製した精製蛋白質をユー・ケー・レムリが『ネーチャー』、第227巻、第680〜685頁（1970年）に報告している方法に準じ、還元剤の非存在下でSDS−ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量19，000±5，000ダルトンに相当する位置にIFN−γ誘導能ある主たるバンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ウシ血清アルブミン（67，000ダルトン）、オボアルブミン（45，000ダルトン）、大豆トリプシンインヒビター（20，100ダルトン）及びα−ラクトアルブミン（14，400ダルトン）であった。

【0026】

【実験例2−2　等電点】精製蛋白質を常法にしたがってクロマトフォーカシングしたところ、4．8±1．0に等電点を示した。

【0027】

【実験例2−3　部分アミノ酸配列】実施例1で調製した精製蛋白質を含む水溶液の一部をとり、約50μlまで濃縮した。濃縮物に3％（w/v）SDS、60％（v/v）グリセロール及びジチオトレイトール60mg/mlからなる溶液25μlを加え、50℃で30分間インキュベート後、15％（w/v）ポリアクリルアミドゲル上に移し、常法にしたがって電気泳動した。その後、ゲルを0．1％（w/v）クーマシー・ブリリアント・ブルーR250を含む50％（v/v）水性メタノールと10％（v/v）酢酸水溶液の混液に浸漬して染色し、12％（v/v）水性メタノールと7％（v/v）酢酸水溶液の混液で繰返し洗って脱色し、蒸留水中に18時間浸漬して洗浄後、ゲルよりクーマシー・ブリリアン

トブルー染色された当該蛋白質を含む部分を切出し、凍結乾燥した。

【0028】次に、乾燥ゲルをシグマ製『TPCKトリプシン』2μg/mlを含む100mM炭酸水素ナトリウム、0.5mM塩化カルシウム及び0.02%(v/v)Tween 20水溶液からなる溶液0.6mlに浸漬し、37℃で18時間インキュベートして蛋白質をトリプシン消化した。そして、消化物を遠心分離して上清を採取する一方、沈澱部を0.001%(v/v)Tween 20を含む1%(v/v)水性トリフルオロ酢酸1mlに浸漬し、室温下で4時間振盪後、遠心分離し上清を採取した。新たに生じた沈澱を0.001%(v/v)Tween 20を含む70%(v/v)水性トリフルオロ酢酸、0.001%(v/v)Tween 20を含む50%(v/v)水性トリフルオロ酢酸及び50%(v/v)水性アセトニトリルの順序で上記と同様に処理し、得られた上清と上記で得られた上清をプールし、250μlまで濃縮後、遠心濾過した。

【0029】斯くして得られたペプチド断片を含む水溶液を、予め0.1%(v/v)水性トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた東ソー製高速液体クロマトグラフィー用カラム『HPLC ODS 120T』に負荷し、カラムを0.1%(v/v)水性トリフルオロ酢酸で洗浄後、溶出液中のペプチド濃度を吸光光度計により214nm及び280nmの波長でモニターしながら、0%(v/v)から70%(v/v)に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸を0.5ml/分の流速で通液した。そして、通液開始から約75分後又は約55分後に溶出した画分(以下、それぞれ「ペプチド断片A」又は「ペプチド断片B」という。)を別々に採取した。このときの溶出パターンを図1に示す。

【0030】パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『モデル473A型』を使用し、常法にしたがってこれらペプチド断片A及びBのアミノ酸配列を調べたところ、それぞれ、配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0031】

【実験例2 生物作用】

【0032】

【実験例2−1(a) 脾細胞由来T細胞におけるIFN−γ産生の誘導】8週齢の雌BDF1マウスから脾臓を摘出し、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.4)中で分散し、新鮮な同一培地で洗浄後、ゲイ緩衝液(pH8.0)中に浸漬して溶血させた。得られた脾細胞を10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)に細胞密度1×10^7個/mlになるように懸濁した後、和光純薬工業製脾細胞分離用ナイロンウールカラムに負荷し、5%CO_2インキュベータ中、37℃で1時間インキュベートした。その後、

カラムに10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)を通液してT細胞を採取し、新鮮な同一培地で洗浄し、下記のIFN−γ誘導試験に供した。

【0033】細胞密度1×10^6個/mlになるようにRPMI1640培地(pH7.4)に浮遊させたマウスT細胞を96ウエルマイクロプレート上に0.15mlずつとり、精製蛋白質を10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)で適宜希釈して0.05ml加えた後、0.5μg/mlコンカナバリンAの存在下又は非存在下で5%CO_2インキュベータ中、37℃で24時間培養した。その後、各ウエルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生したIFN−γを通常の酵素免疫測定法により測定した。同時に、精製蛋白質を省略した以外は同一の系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN−γの標準品には、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準マウスIFN−γ(Gg02−901−533)を使用し、国際単位(IU)に換算して表示した。

【0034】その結果、対照系において有意なIFN−γの産生が認められなかったのに対して、精製蛋白質を加えた系では顕著なIFN−γの産生が認められ、0.02乃至10μg/mlの用量で、コンカナバリンAの非存在下でマウスT細胞1×10^5個当たり約2乃至600IU、コンカナバリンAの存在下で約2乃至2,000IUのIFN−γが産生していた。このことは、当該蛋白質に免疫担当細胞におけるIFN−γの産生を誘導する作用のあることを裏付けている。

【0035】なお、この発明を通じて当該蛋白質の1単位とは、コンカナバリンAの存在下で上記のようにして試験したときに、IFN−γを160IU誘導する蛋白質の量と定義する。

【0036】

【実験例2−1(b) キラー細胞の細胞障害性増強】100μg/mlカナマイシン、5×10^{-5}M 2−メルカプトエタノール及び10%(v/v)牛胎児血清を含むRPMI1640培地(pH7.2)に実験例2−1(a)と同様にして調製したマウス脾細胞を細胞密度1×10^7個/mlになるように浮遊させ、組換え型ヒトインターロイキン2を0、1、5又は10ng/ml加えた後、2.5ml宛培養フラスコに収容した。培養フラスコ内の細胞浮遊液に精製蛋白質を0、0.8、1.6又は[illegible]単位/ml加え、5%CO_2インキュベータ中、37℃で72時間培養し、新鮮なRPMI1640培地(pH7.2)で洗浄後、脾細胞を予め放射性クロム酸ナトリウムで標識したYAC−1細胞(ATCC TIB160)とともに効果細胞/標的細胞比20:1又は[illegible]:1の割合で新鮮なRPMI1640培地(pH7.2)に浮遊させた。細胞浮遊液を96ウエルマイクロプレートにとり、5%CO_2インキュベータ中、3

7℃で4時間培養し、培養上清中の ^{51}Crによる放射能をガンマカウンタにより測定した。結果を表1に示す。

【0037】表1の結果は、この発明の蛋白質にキラー細胞による細胞障害性を有意に増強する性質があり、しかも、その性質がインターロイキン2により顕著に増強されることを示している。

【0038】

【表1】

作用因子		細胞障害性(%)	
当該蛋白質 (単位/ml)	インターロイキン2 (u/ml)	効果細胞/標的細胞 40/1	効果細胞/標的細胞 20/1
100	0	48.6	46.0
20	0	35.5	27.5
4	0	33.0	17.7
0.8	0	22.9	14.5
0	0	0.1	0.0
100	1	55.8	55.2
20	1	54.2	46.4
4	1	40.5	26.4
0.8	1	22.1	10.3
0	1	0.4	0.0
100	5	63.6	59.1
20	5	63.2	46.1
4	5	56.2	44.6
0.8	5	38.4	23.4
0	5	1.0	0.2
100	10	67.8	56.5
20	10	67.7	59.9
4	10	63.8	54.1
0.8	10	46.2	31.7
0	10	1.0	0.5

【0039】以上のような理化学的性質を有する蛋白質は未だ知られておらず、新規物質であると判断される。そこで、本発明者が、マウス肝細胞からmRNAを単離し、これを鋳型に前記実験例2－3で明らかにした部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーの存在下でRT－PCR反応させて当該蛋白質を部分コードするDNA断片を採取し、これをプローブにして上記mRNAから別途作製したcDNAライブラリーを鋭意検索した結果、471塩基対からなる、配列表における配列番号4に示す5′末端からの塩基配列のDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、当該蛋白質は、157個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号3に示すN末端からのアミノ酸配列を有していることが判明した。なお、配列表における配列番号3において、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸は、メチオニン又はトレオニンを意味するものとする。

【0040】配列表における配列番号3及び4に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の操作を要約すると、次のようになる。

（1）　クロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてマウス肝細胞から当該蛋白質を単離し、高度に精製した。

（2）　精製蛋白質をトリプシンで消化し、消化物から2種類のペプチド断片を単離し、そのアミノ酸配列を決定した。

（3）　マウス肝細胞からmRNAを採取し、これを鋳型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドのプライマーの存在下でRT－PCR反応させてDNA断片を調製する一方、それら部分アミノ酸配列に基づき別途化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにしてそれらDNA断片を検索し、当該蛋白質を部分コードするDNA断片を採取した。

（4）　別途、前記mRNAを鋳型にcDNAライブラリーを作製し、これに上記で調製したDNA断片をプロ

ーブにしてハイブリダイズさせ、顕著な会合を示す形質転換体を採取した。
（５）形質転換体からｃＤＮＡを採取し、その塩基配列を決定し、解読するとともに、解読したアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較して、その塩基配列が当該蛋白質をコードしていることを確認した。

【００４１】次の実験例３では、上記の工程（３）乃至（５）を中心に具体的に説明するが、本例で用いた手法自体は斯界において公知であり、例えば、ティー・マニャティス等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、１９８９年、コールド・スプリング・ハーバー発行や、村松正實『ラボマニュアル遺伝子工学』、１９８８年、丸善出版発行などにも詳述されている。

【００４２】

【実験例３　ＤＮＡの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列】

【００４３】

【実験例３－１　全ＲＮＡの調製】実験例１と同様にして調製したマウス肝細胞を湿重量で３ｇとり、これを６Ｍグアニジンイソチオシアナート、１０ｍＭクエン酸ナトリウム及び０．５％（ｗ／ｖ）ＳＤＳからなる混液（ｐＨ７．０）２０ｍｌに浸漬し、ホモゲナイザーで破砕した。次に、常法にしたがって、３５ｍｌ容遠心管に５．７Ｍ塩化セシウムを含む０．１Ｍ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．５）を[illegible]ｍｌ注入し、その上に細胞破砕物を１０ｍｌ重層し、この状態で２０℃、２５，０００ｒｐｍで２０時間超遠心分離し、ＲＮＡ画分を採取した。このＲＮＡ画分を１５ｍｌ容遠心管にとり、等容量のクロロホルム／イソブタノール混液（４：１）を加え、５分間振盪し、４℃、１０，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離した後、水層部を採取し、２．５倍容のエタノールを加え、－２０℃で２時間静置して全ＲＮＡを沈殿させた。この沈殿を採取し、７５％（ｖ／ｖ）水性エタノールで洗浄後、滅菌蒸留水０．５ｍｌに溶解して以下の実験に供した。なお、全ＲＮＡの収量は約[illegible]ｍｇであった。

【００４４】

【実験例３－２　蛋白質を部分的にコードするＤＮＡ断片の調製】実験例３－１で得た全ＲＮＡ１μｇに２５ｍＭ塩化マグネシウムを４μｌ、１０×ＰＣＲ緩衝液（１００ｍＭトリス－塩酸緩衝液（ｐＨ８．３）、５００ｍＭ塩化カリウム）を２μｌ、１ｍＭ　ｄＮＴＰミックスを８μｌ、１単位／μｌのＲＮａｓｅインヒビターを１μｌ、２．５単位／μｌの逆転写酵素を１μｌ及び２．５μＭランダムヘキサマーを１μｌ加え、滅菌蒸留水で２０μｌとした。混合物を０．５ｍｌ容反応管にとり、常法にしたがって２５℃で１０分間、４２℃で３０分間、９９℃で５分間、５℃で５分間インキュベートして逆転写反応させ、第一ストランドｃＤＮＡを含む水溶液を得た。

【００４５】この第一ストランドｃＤＮＡ水溶液２０μｌに２５ｍＭ塩化マグネシウムを１μｌ、１０×ＰＣＲ緩衝液を８μｌ、２．５単位／μｌアンプリタックＤＮＡポリメラーゼを０．５μｌ、さらに、センスプライマー又はアンチセンスプライマーとしてプライマー１及びプライマー２をそれぞれ１ｐｍｏｌずつ加え、滅菌蒸留水で１００μｌとした。そして、常法により、混合物を９４℃で１分間、４５℃で２分間、７２℃で３分間、この順序でインキュベートするサイクルを４０回繰返して反応させ、第一ストランドｃＤＮＡを鋳型に当該蛋白質を部分的にコードするＤＮＡ断片を増幅した。なお、プライマー１及びプライマー２は、配列表における配列番号１及び２におけるＰｒｏ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ－Ｉｌｅ－Ａｓｐ－Ａｓｐ－Ｉｌｅ又はＰｈｅ－Ｇｌｕ－Ａｓｐ－Ｍｅｔ－Ｔｈｒ－Ａｓｐ－Ｉｌｅで表わされるアミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドであり、それぞれ、５′－ＡＴＲＴＣＲＴＣＤＡＴＲＴＴＹＴＣＮＧＧ－３′又は５′－ＴＴＹＧＡＲＧＡＹＡＴＧＡＣＮＧＡＹＡＴ－３′で表わされる塩基配列を有していた。

【００４６】このようにして得たＰＣＲ産物の一部をとり、常法により２％（ｗ／ｖ）アガロースゲル上で電気泳動して分画し、ナイロン膜上に移し取り、０．４Ｎ水酸化ナトリウムで固定し、２×ＳＳＣで洗浄し、風乾後、５×ＳＳＰＥ、５×デンハルト液、０．５％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ及び１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡを含むプレハイブリダイゼーション液に浸漬し、６５℃で３時間インキュベートした。別途、プローブとして、配列表の配列番号１におけるＰｈｅ－Ｇｌｕ－Ｇｌｕ－Ｍｅｔ－Ａｓｐ－Ｐｒｏで表わされるアミノ酸配列に基づき５′－ＴＴＹＧＡＲＧＡＲＡＴＧＧＡＹＣＣ－３′で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰとＴ４ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブを１ｐｍｏｌとり、これを５×ＳＳＰＥ、５×デンハルト液、０．５％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ及び１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡを含む溶液に加え、前記ナイロン膜を浸漬し、４５℃で２４時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、常法にしたがって洗浄し、オートラジオグラフィーしたところ、目的とするＤＮＡ断片がＰＣＲ産物に含まれていた。

【００４７】さらに、残りのＰＣＲ産物にプラスミドベクター「ｐＴ７　Ｂｌｕｅ　Ｔ」を５０ｎｇと適量のＴ４　ＤＮＡリガーゼを加え、さらに、１００ｍＭ　ＡＴＰを終濃度１ｍＭまで加えた後、１６℃で１８時間インキュベートしてプラスミドベクターにＤＮＡ断片を挿入した。得られた組換えＤＮＡをコンピテントセル法によりノバゲン製大腸菌「ＮｏＶａ　Ｂｌｕｅ」株に導入して形質転換体とした。得られた形質転換体を１０ｇ／ｌバクトトリプトン、２．５ｇ／ｌ塩化ナトリウム、１５ｇ／ｌバクトアガー、１００ｍｇ／ｌアンピシリ

ン、40mg／ml X－Gal及び23．8mg／mlイソプロピル－β－D－チオガラクトピラノシド（以下、「IPTG」と略記する。）を含むプレート培地に植菌し、37℃で24時間培養してコロニーを形成させた。常法にしたがって、プレート培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してコロニーを移し取った後、ナイロン膜を剥離し、0．5N水酸化ナトリウム及び1．5M塩化ナトリウムを含む溶液に7分間浸漬して溶菌した。その後、ナイロン膜を1．5M塩化ナトリウムを含む0．5Mトリス－塩酸緩衝液（pH7．2）に3分間浸漬し、2×SSCで洗浄し、0．4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬して固定し、5×SSCでさらに洗浄し、風乾後、5×SSPE、5×デンハルト液、0．5％（w／v）SDS及び100μg／ml変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。その後、常法にしたがってナイロン膜にプローブ1をハイブリダイズさせ、6×SSCで洗浄後、前記と同様にオートラジオグラフィーし、プローブ1と顕著な会合を示した形質転換体をプレート培地から採取した。

【0048】この形質転換体をアンピシリン100μg／mlを含むL－ブロス培地（pH7．2）に接種し、37℃で18時間培養後、培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ－SDS法により組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により調べたところ、この組換えDNAは配列表の配列番号4に示す塩基配列における第85番目乃至381番目に対応する塩基配列のDNA断片を含んでいた。

【0049】

【実施例3－3　mRNAの調製】実施例3－1で得た全RNAを含む水溶液を0．05mlとり、これに1mMナトリウム－EDTA及び0．1％（w／v）SDSを含む10mMトリス－塩酸緩衝液（pH7．5）を0．5ml加え全量を1mlとした。混合液に[illegible]を1ml加え、65℃で5分間加熱して変性させた後、直ちに氷浴中で3分間冷却した。5M塩化ナトリウムを0．2ml加え、37℃で10分間インキュベートし、25℃、16，000rpmで10分間遠心分離し、上清を除いて得られたペレット状の沈殿に滅菌蒸留水0．5mlを加えて懸濁させ、65℃で5分間インキュベートしてオリゴテックスからmRNAを溶出させた。得られたmRNAは約5μgであった。

【0050】

【実施例3－4　cDNAライブラリーの作製】アマシャム製cDNAクローニングキット「cDNA合成システム・プラス」を使用し、実施例3－3で調製したmRNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1．5ml容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液4μl、ピロリン酸ナトリウム溶液1μl、ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液1μl、デオキシヌクレオチド三燐酸混合液2μl及びオリゴ（dT）プライマー溶液1μlをこの順序で加え、さらに、実施例3－3で得たmRNAを2μg加えた後、滅菌蒸留水で19μlとした。混合液に逆転写酵素20単位を含む溶液1μlを加え、42℃で40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0051】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を37．5μl、大腸菌由来のリボヌクレアーゼHを0．8単位、DNAポリメラーゼIを23単位この順序で加え、滅菌蒸留水で100μlとした後、12℃で60分間、22℃で60分間インキュベートし、T4 DNAポリメラーゼを2単位加え、37℃でさらに10分間インキュベートして第二ストランドcDNAを含む反応物を得た。反応物に0．25M EDTA（pH8．0）を4μl加えて反応を停止させた後、常法によりフェノール／クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させてcDNAを採取した。

【0052】このようにして得たcDNAにL／K緩衝液を2μl、EcoRIアダプターを250ピコモル、T4 DNAリガーゼを5単位この順序で加え、滅菌蒸留水で20μlとした後、15℃で16時間インキュベートしてcDNAの両端にEcoRIアダプターを連結させた。反応物に0．25M EDTAを2μl加えて酵素を失活させ、常法により分子篩クロマトグラフィーにより未反応のEcoRIアダプターを除去し、L／K緩衝液を40μl、T4ポリヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で全量100μlとし、37℃で30分間インキュベートしてEcoRI切断部位をリン酸化した後、反応物をフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿してDNAを採取した。DNAに[illegible]λgt10アームを含むL／K緩衝液を1μl、T4 DNAリガーゼを5単位加え、滅菌蒸留水で全量10μlとし、15℃で16時間インキュベートしてライゲーションした後、通常の生体外パッケージング法を利用して組換えDNAを含むファージを得た。

【0053】

【実施例3－5　組換えDNAのクローニング】アマシャム製大腸菌NM514株に実施例3－4で調製したファージを常法により感染させた後、10g／lバクトトリプトン、5g／lバクトイーストエキストラクト、10g／l塩化ナトリウム及び15g／lバクトアガーを含む寒天培地（pH7．0）に植菌し、37℃で6時間培養してプラークを形成させた。寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してプラークをナイロン膜上に移し取った後、ナイロン膜を剥離し、まず、0．5M水酸化ナトリウムと1．5M塩化ナトリウムを含む水溶液に2分間、次に、1．5M塩化ナトリウムを含む0．5

Mトリス－塩酸緩衝液（pH7．0）に5分間浸漬した。ナイロン膜を5×SSCで濯ぎ、風乾後、5×SSPE、5×デンハルト溶液、0．5%（w/v）SDS及びサケ精子DNAを100μg/ml含む混液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。その後、ナイロン膜をアマシャム製DNA標識キット「レディ・プライムDNA標識システム」を用いて32P標識した実験例3－2で得たプローブ2としてのDNA断片の適量と5×SSPE、5×デンハルト溶液、0．5%（w/v）SDS及びサケ精子DNAを100μg/ml含む混液中、60℃で20時間インキュベートしてハイブリダイズさせ、以後、前記と同様にオートラジオグラフィーして、プローブ2に顕著な会合を示したファージDNAクローンを採取した。

【0054】常法にしたがってこのクローンを大腸菌中で増幅し、菌体から組換えDNAを抽出した。組換えDNAを制限酵素EcoRIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19（ATCC37254）を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とプラスミド断片をT4DNAリガーゼで連結して組換えDNAとした。そして、この組換えDNAを通常のコンピテントセル法により大腸菌JM109株（ATCC53323）に導入し、形質転換体を得た。

【0055】

【実験例3－4　塩基配列とアミノ酸配列の決定】実験例3－3で得た形質転換体をLブロス培地（pH7．2）に植菌し、37℃で18時間振盪培養した。培養物から形質転換体を採取し、通常のアルカリ－SDS法により処理してこの発明のDNAを含む組換えDNAを得た。蛍光光度計を使用する自動シーケンサーを用いて分析したところ、この組換えDNAは配列表における配列番号5に示す5'末端からの塩基配列を含んでおり、その塩基配列を解読したところ、同じ配列番号5に併記したN末端からのアミノ酸配列がコードされていることが判明した。このアミノ酸配列においては、その配列番号5の[illegible]番目又は[illegible]番目に配列番号1及び2に示す部分アミノ酸配列が含まれており、このことは、この発明の蛋白質が配列表における配列番号3に示すN末端からのアミノ酸配列を有すること、あわせて、ヒト細胞においては、当該蛋白質が配列表における配列番号4に示す5'末端からの塩基配列を有するDNAによりコードされていることを示している。

【0056】以上述べたように、ヒト細胞においてIFN－γの産生を誘導する蛋白質は、本発明者の長年にわたる研究の一成果として見出されたものであり、従来公知の蛋白質には見られない独特の理化学的性質を具備している。この発明は、組換えDNA技術を応用することにより、この蛋白質を創製しようというものである。以下、実施例等を参照しながら、この発明の蛋白質とその製造方法等につき、具体的に説明する。

【0057】この発明でいう蛋白質とは、特定の理化学的性質を具備する、天然由来の蛋白質及び組換えDNA技術により調製された蛋白質全般を意味する。この発明の蛋白質は、通常、一部又は全部が解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例として、例えば、配列表における配列番号3に示すN末端からのアミノ酸配列か、それに相同的なアミノ酸配列が挙げられる。配列番号3のアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の生物作用を実質的に変えることなく、配列番号3のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成、培養温度・pHなどに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の生物作用は保持しているものの、配列番号3のアミノ酸配列におけるN末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の産生することがある。斯かる変異体も、それが免疫担当細胞においてIFN－γの産生を誘導するかぎり、当然、この発明の蛋白質に包含される。

【0058】この発明の蛋白質は、それをコードするDNAを含む形質転換体を栄養培地で培養し、産生した蛋白質を培養物から採取することにより製造することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号4に示す5'末端からの塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ることができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子の縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてもよい。また、DNAが宿主中で実際に当該蛋白質の産生を発現するために、当該蛋白質又はその変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてもよい。

【0059】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものであっても人為的に合成されたものであってもよい。天然の給源としては、例えば、ヒトの肝臓細胞が挙げられ、それらの細胞からこの発明のDNAを含む遺伝子を得ることができる。例えば、[illegible]を含有してなる培養物を界面活性剤で処理して破砕し、全RNAを単離する。この全RNAをオリゴ（dT）セルロース、オリゴd（T）ラテックスなどで処理してポリ（A）+RNAとした後、蔗糖密度勾配遠心法などにより分画してmRNAを単離する。このmRNAを鋳型に逆転写酵素とポリメラーゼを作用させて二重鎖cDNAとし、これを自律複製可能な適宜ベクターに挿入し、

得られた組換えDNAを大腸菌などの適宜宿主に導入して形質転換体とする。この形質転換体を栄養培地で培養し、培養物にコロニーハイブリダイゼーション法を適用してこの発明の蛋白質をコードするDNAを含む形質転換体を採取する。斯くして得られた形質転換体を通常一般の方法により処理すれば、この発明のDNAが得られる。一方、この発明のDNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号1に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を分離し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0060】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、例えば、pKK223－2、pGEX－2T、pRL－λ、pBTrp2 DNA、pUB110、YEp13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121などのプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核生物で発現させるにはpKK223－2、pGEX－2T、pRL－λ、pBTrp2、pUB110、YEp13が、また、動植物由来の細胞で発現させるにはTiプラスミド、Riプラスミド、pBI121が好適である。

【0061】斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、この発明のDNAを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターを切断するに当たり、ヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、II型の制限酵素、詳細には、Sau 3AI、Eco RI、Hind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られた組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0062】この発明による組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、栄養培地で培養し、免疫担当細胞においてIFN－γの産生を誘導する蛋白質を産生するものを選択すればよい。

【0063】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該蛋白質を産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンスティープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に植菌し、栄養培地を温度25乃至65℃、pH2乃至8に保ちつつ、通気攪拌などによる好気的条件下で約1乃至10日間培養すれば、当該蛋白質を含む培養物が得られる。この培養物はIFN－γ誘導剤としてそのまま使用可能ではあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体を破砕した後、濾過、遠心分離などにより当該蛋白質を菌体若しくは菌体破砕物から分離し、精製する。精製には菌体又は菌体破砕物を除去した培養物に、例えば、濃縮、塩析、透析、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの生理活性蛋白質を精製するための斯界における通常一般の方法が採用でき、必要に応じて、これら方法を適宜組合せればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製した蛋白質を濃縮・凍結乾燥して液状若しくは固状にすればよい。

【0064】前述のとおり、この発明の蛋白質は、免疫担当細胞においてIFN－γの産生を誘導する性質を有している。この性質により、この発明の蛋白質は、細胞培養法によるIFN－γの製造に有用であって、さらには、IFN－γが感受性を有する疾患、例えば、エイズや尖圭コンジローマなどのウイルス性疾患、腎癌、肉芽腫、菌状息肉症、脳腫瘍などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患の治療剤・予防剤として有用である。

【0065】この発明の蛋白質は、通常、免疫担当細胞を培養してIFN－γを産生させるための培養培地に共存させるか、IFN－γが関与する疾患の治療・予防のためにヒトを含む哺乳類の体内に直接投与される。すなわち、前者の用途においては、末梢血から採取される白血球や、例えば、HBL－38細胞、Mo細胞、Jurkat細胞、HuT－78細胞、EL4細胞、L12－R4細胞などの株化された免疫担当細胞をこの発明の蛋白質を含む適宜の培養培地に浮遊させる。必要に応じて、培養培地にマイトジ

ェンやインターロイキン２、抗ＣＤ３抗体などのＴ細胞刺激物質を加え、培養培地を温度約３０乃至４０℃、ｐＨ約５乃至８に保ちつつ、培養培地を適宜新鮮なものと取替えながら、通常一般の方法により約１乃至１００時間培養する。斯くして得られる培養物を生理活性物質を精製するための通常一般の方法、すなわち、濃縮、塩析、透析、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの１種若しくは２種以上を適宜組合せて適用することにより、ＩＦＮ－γを採取することができる。

【００６６】一方、ＩＦＮ－γ感受性疾患の治療・予防のためには、哺乳類の体内にこの発明によるＩＦＮ－γ誘導剤を直接投与すればよい。具体的には、この発明のＩＦＮ－γ誘導剤を投与に適した適宜剤型に調製後、哺乳類に経口投与するか、例えば、皮内、皮下、筋肉内、静脈内又は腹腔内に注射投与する。この発明の蛋白質を投与し得る哺乳類はヒトに限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、サルなどの哺乳動物であってもよい。この発明の蛋白質は強力なＩＦＮ－γ誘導能を有することから、一般に少量で所期のＩＦＮ－γ産生を誘導でき、また、毒性も極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明の蛋白質は、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のＩＦＮ－γ産生を迅速に誘導できる利点がある。

【００６７】加えて、この発明の蛋白質は、キラー細胞による細胞障害性を増強する性質も顕著なことから、インターロイキン２や腫瘍壊死因子と合併使用することにより、養子免疫療法による固形癌、腎細胞癌、[illegible]などの[illegible]を含む[illegible]の治療における治療効果や副作用の軽減に顕著な効果を発揮する。

【００６８】以下、具体的実施例を用いてこの発明による蛋白質の製造方法、性質及び用途を具体的に説明する。

【００６９】

【実施例１　複製可能な組換えＤＮＡと形質転換体】宝酒造製ＰＣＲキット「ＧｅｎｅＡｍｐ　ＲＮＡ　ＰＣＲ　Ｋｉｔ」を使用して、実験例３－１の方法により得た全ＲＮＡからｃＤＮＡを調製した。すなわち、[illegible]に、２５ｍＭ塩化マグネシウムを４μｌ、１０×ＰＣＲ緩衝液を２μｌ、１ｍＭ　ｄＮＴＰミックスを８μｌ、１単位／μｌのＲＮａｓｅインヒビターを１μｌ、２．５単位／μｌの逆転写酵素を１μｌ、２．５μＭランダムヘキサマーを１μｌ及び実験例３－１の方法により得た全ＲＮＡ１μｇをとり、滅菌蒸留水で２０μｌとした。そして、混合物を２５℃で１０分間、４２℃で３０分間、９９℃で５分間、５℃で５分間この順序でインキュベートして第一ストランドｃＤＮＡ含む反応物を得た。

【００７０】この反応物を２０μｌとり、これに２５ｍＭ塩化マグネシウムを４μｌ、１０×ＰＣＲ緩衝液を８μｌ、２．５単位／μｌアンプリタックＤＮＡポリメラーゼを０．５μｌ、配列表の配列番号５におけるＮ末端及びＣ末端付近のアミノ酸配列に基づき化学合成した５´－ＣＧＡＧＧＧＡＴＣＧＡＡＣＴＴＴＧＧＣＣＧＡＣＴＴＣ－３´又は５´－ＣＧＡＧＧＡＡＴＴＣＣＴＡＡＣＴＴＴＧＡＴＧＴＡＡＧ－３´で表わされる塩基配列のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの適量を加え、滅菌蒸留水で１００μｌとした。次に、常法により、この混合物を９４℃で１分間、５５℃で２分間、７２℃で３分間この順序でインキュベートするサイクルを４０回繰返し、得られたＰＣＲ産物を制限酵素Ｂａｍ　ＨＩ及びＥｃｏ　ＲＩで切断してＢａｍ　ＨＩ－Ｅｃｏ　ＲＩ　ＤＮＡ断片を得た。

【００７１】このＤＮＡ断片を適量の滅菌蒸留水中に１００ｎｇとり、これに、予め制限酵素Ｂａｍ　ＨＩ及びＥｃｏ　ＲＩで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター「ｐＧＥＸ－２Ｔ」を１０ｎｇ、適量のＴ４　ＤＮＡリガーゼ並びに１０ｍＭ　ＡＴＰを最終濃度１ｍＭになるように加えた後、１６℃で１８時間インキュベートした。得られた組換えＤＮＡをコンピテントセル法により大腸菌ＤＨ５（ＡＴＣＣ５３８６８）株に導入して形質転換し、これをアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬブロス培地（ｐＨ７．２）に接種し、３７℃で１８時間培養した後、通常のアルカリ－ＳＤＳ法により組換えＤＮＡを抽出した。

【００７２】この組換えＤＮＡを「ｐＭＧＴＧ－１」と命名するとともに、その構造をジデオキシ法により調べたところ、図２に見られるように、このｐＭＧＴＧ－１においては、配列表における配列番号１に示す塩基配列の[illegible]ＴＧ－ｃＤＮＡがＴａｃプロモーター及びグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ遺伝子の下流に連結されていた。

【００７３】

【実施例２　形質転換体による蛋白質の製造】実施例１の方法で得た形質転換体をアンピシリン５０μｇ／ｍｌを含むＬブロス培地（ｐＨ７．２）に接種し、振盪しながら３７℃で１８時間培養した。この培養物を１％（ｖ／ｖ）の割合で新鮮な１８ｌの同一培地に接種し、３７℃で振盪培養した。そして、波長６５０ｎｍにおける培養物の吸光度が０．６に達した時点でＩＰＴＧを最終濃度１ｍＭまで加え、さらに５時間培養した。その後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１６ｍＭ燐酸水素二ナトリウム及び４ｍＭ燐酸二水素ナトリウムを含む混液（ｐＨ７．３）に浮遊させ、常法により超音波処理後、菌体破砕物を遠心分離し、上清を採取した。

【0074】この上清を予め150mM塩化ナトリウムを含む50mMトリス－塩酸緩衝液（pH7．5）で平衡化させておいたファルマシア製『グルタチオン・セファロース4B』カラムに負荷し、新鮮な同一緩衝液で洗浄後、カラムに5mM還元型グルタチオンを含む50mMトリス－塩酸緩衝液（pH8．0）を通液して蛋白質を溶出させた。次いで、蛋白質を含む画分に最終濃度が2．5mMになるように塩化カルシウムを加えるとともに、トロンビンを1，000単位加え、25℃で18時間インキュベートし、反応物を予め150mM塩化ナトリウムを含む50mMトリス－塩酸緩衝液（pH7．5）で平衡化させておいたグルタチオン・セファロース4Bカラムに通液して非吸着画分を採取した。その後、この画分を濃縮し、凍結乾燥したところ、比活性約5×10^{5}単位／mg蛋白質の当該蛋白質を含む固状物が培養物1l当たり約3mgの収量で得られた。

【0075】実施例2と同様にしてこの精製蛋白質の理化学的性質を調べたところ、この精製蛋白質は、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法により測定すると分子量18，000－5，000ダルトンを、また、クロマトフォーカシング法により測定すると4．5±1．0に等電点を示した。さらに、実験例2－4の方法により試験したところ、精製蛋白質は、コンカナバリンAの非存在下及び存在下で免疫担当細胞におけるIFN－γ産生をよく誘導し、また、キラー細胞の細胞障害性も顕著に増強した。これは、組換えDNA技術によっても、当該蛋白質を製造し得ることを裏付けるものである。

【0076】

【発明の効果】この発明は、免疫担当細胞においてIFN－γの産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。この発明の蛋白質は、通常、アミノ酸配列の一部又は全部が解明された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN－γ誘導能を発揮する。これにより、この発明の蛋白質は、細胞培養法によりIFN－γを製造するためのIFN－γ誘導剤として、さらには、IFN－γに感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患などに対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。

【0077】この発明の蛋白質は強力なIFN－γ誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN－γ産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明の蛋白質は、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のIFN－γ産生を迅速に誘導できる利点がある。くわえて、この発明の蛋白質はキラー細胞による細胞障害性を増強する性質が顕著なことから、インターロイキン2や腫瘍壊死因子と適宜併用することにより、養子免疫療法による肺癌、腎臓癌、乳癌などの固形癌を含む悪性腫瘍の治療における治療効果や副作用の改善に顕著な効果を発揮する。

【0078】斯くも有用なこの発明の蛋白質は、これをコードするこの発明のDNAを利用することにより、所望量を容易に製造することができる。

【0079】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると言える。

【0080】

【配列表】配列番号：1
配列の長さ：25
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント

配列

```
Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln
1               5                   10                  15
Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
        20                  25
```

【0081】配列番号：2
配列の長さ：18
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
フラグメント型：中間部フラグメント

配列

```
Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro
1               5                   10                  15
Gln
```

【0082】配列番号：3
配列の長さ：157
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド

配列

```
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn Asp
1               5                   10                  15
```

23　　24
Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp
20　　25　　30
Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile Tyr Met Tyr
35　　40　　45　　50
Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser Val Lys Asp Ser
55　　60　　65
Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met
70　　75　　80　　85
Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln
90　　95　　100
Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu
105　　110　　115
Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu
120　　125　　130　　135
Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn
140　　145　　150
Leu His Gln Ser
155

【００８３】配列番号：4
配列の長さ：471
配列の型：核酸
20
配列

AACTTTGGCC GACTTCACTG TACAACCGCA GTAATACGGA ATATAAATGA CCAAGTTCTC　60
TTCGTTGACA AAAGACAGCC TGTGTTCGAG GATATGACTG ATATTGATCA AAGTGCCAGT　120
GAACCCCAGA CCAGACTGAT AATATACATG TACAAAGACA GTGAAGTAAG AGGACTGGCT　180
GTGACCCTCT CTGTGAAGGA TAGTAAAAYG TCTAACCCTC TCTGTAAGAA CAAGATCATT　240
TCCTTTGAGG AAATGGATCC ACCTGAAAAT ATTGATGATA TACAAAGTGA TCTCATATTC　300
TTTCAGAAAC GTGTTCCAGG ACACAACAAG ATGGAGTTTG AATCTTCACT GTATGAAGGA　360
CACTTTCTTG CTTGCCAAAA GGAAGATGAT GCTTTCAAAC TCATTCTGAA AAAAAAGGAT　420
GAAAATGGGG ATAAATCTGT AATGTTCACT CTCACTAACT TACATCAAAG T　471

【００８４】配列番号：5
配列の長さ：471
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の特徴
特徴を表す記号：CDS
30　配列の特徴
起源
生物名：マウス
配列の特徴
配列を表す記号：1..471 rat peptide
配列の種類：cDNA to mRNA
配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT　48
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1　　5　　10　　15
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG　96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
20　　25　　30
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA　144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
35　　40　　45
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT　192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
50　　55　　60
GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT　240
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile

```
65                  70                  75                  80
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT       288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
                85                  90                  95
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG       336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
            100                 105                 110
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA       384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
        115                 120                 125
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT       432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
    130                 135                 140
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT                   471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145                 150                 155
```

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の蛋白質をトリプシン消化して得られるペプチド断片の高速液体クロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

【図2】この発明による組換えDNAであるpMGTG1の構造を示す図である。

【符号の説明】

ＭＧＴＧ　１　ｃＤＮＡ　この発明の蛋白質をコードするｃＤＮＡ

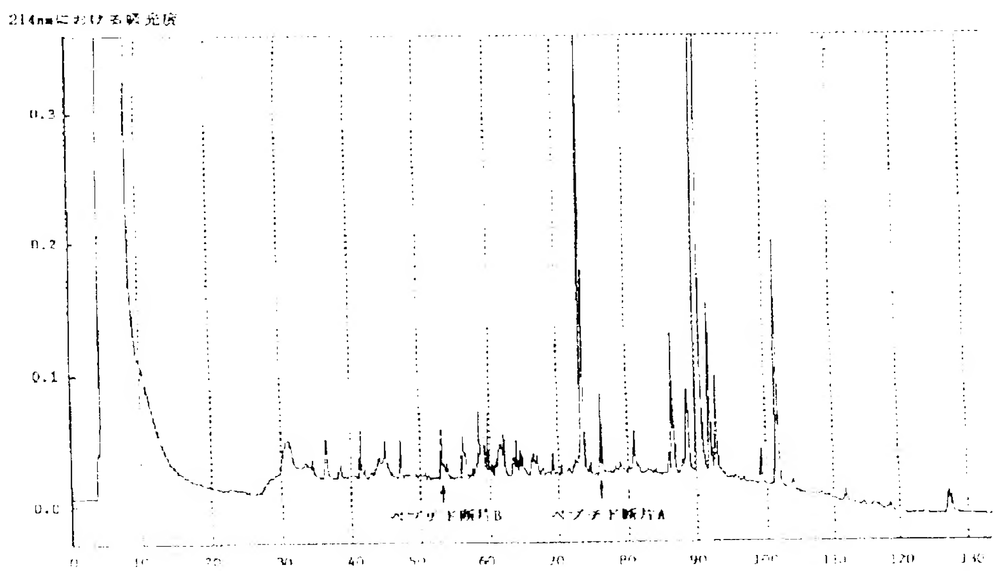
Ｐｔａｃ　ｔａｃプロモータ

ＧＳＴ　グルタチオンＳトランスフェラーゼ遺伝子

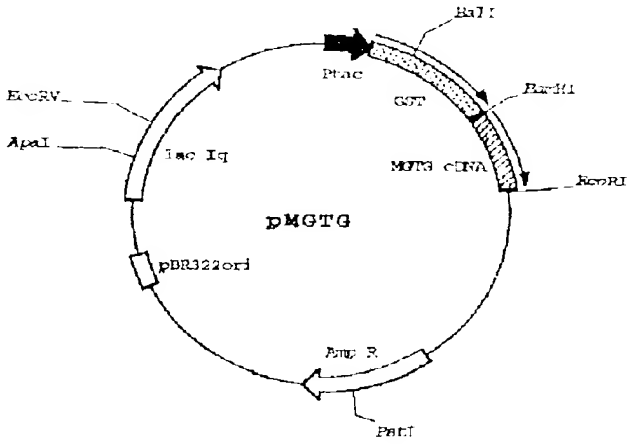
ＡｍｐＲ　アンピシリン耐性遺伝子

ｏｒｉ　大腸菌における複製開始点

【図1】



【図2】

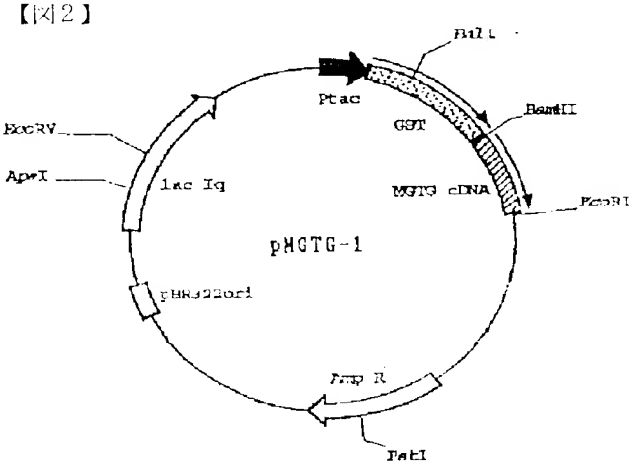


【手続補正書】
【提出日】平成6年8月29日
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】請求項9
【補正方法】変更
【補正内容】
【請求項9】　DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号4に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。
【手続補正2】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】請求項13
【補正方法】変更
【補正内容】
【請求項13】　DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号4に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項11又は12に記載の形質転換体。
【手続補正3】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】請求項19
【補正方法】変更
【補正内容】
【請求項19】　DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号4に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項16、17又は18に記載の蛋白質の製造方法。
【手続補正4】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００４６
【補正方法】変更
【補正内容】
【００４６】　このようにして得たPCR産物の一部をとり、常法により5% (w/v) アクロースゲル上で電気泳動にて分画し、ナイロン膜上に移し取り、0.4N水酸化ナトリウムで固定し、2×SSCで洗浄し、風乾後、5×SSPE、5×デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100μg/ml変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション溶液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。別途、プローブとして、配列表の配列番号1にあるPhe Gln Gln Met Asp Pro で表わされるアミノ酸配列に基づき5' TTYGARGAPATGGAYCC 3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、γ-32P-ATPとTポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブ1pmolと、これと5×SSPE、5×デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液にナイロン膜を浸漬し、65℃で3日間インキュベートしてハイブリダイズさせたナイロン膜を6×SSCで水洗し、常法によりオートラジオグラフィーしたところ、目的とするDNA断片がPCR産物に含まれていた。
【手続補正5】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７５

【補正方法】変更
【補正内容】
【0075】実験例2と同様にしてこの精製蛋白質の理化学的性質を調べたところ、この精製蛋白質は、SDS−ポリアクリルアミドゲル電気泳動法又はゲル濾過法により測定すると分子量19，000±5，000ダルトンを、また、クロマトフォーカシング法により測定すると4．8±1．0に等電点を示した。さらに、実験例2−4の方法により試験したところ、精製蛋白質は、コンカナバリンA共存下又は非共存下で免疫担当細胞におけるIFN−γ産生をよく誘導し、また、キラー細胞の[illegible]ことが判明した。このことは、[illegible]によっても、当該蛋白質を製造し得ることを裏付けるものである。

【手続補正書】
【提出日】平成7年8月31日
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0049
【補正方法】変更
【補正内容】
【0049】
【実験例3−3　mRNAの調製】実験例3−1で得た全RNAを含む水溶液を0．05mlとり、これに1mM EDTAと0．1%（w/v）SDSを含む10mMトリス−塩酸緩衝液（pH7．5）を0．5ml加え、滅菌蒸留水を加えて全量を1mlとした。混合物に日本ロシュ製オリゴd（T）ラテックス『オリゴテックス−dT30スーパー』を1ml加え、65℃で5分間加熱して変性させた後、直ちに氷浴中で3分間冷却した。その後、5M塩化ナトリウムを0．2ml加え、37℃で10分間インキュベートし、25℃、10，000rpmで10分間遠心分離し、上清を除いて得られたペレット状沈殿に滅菌蒸留水0．5mlを加えて懸濁させ、65℃で5分間インキュベートしてオリゴテックスからmRNAを溶出させた。回収したmRNAは約[illegible]μgであった。
【手続補正2】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0053
【補正方法】変更
【補正内容】
【0053】
【実験例3−5　組換えDNAのクローニング】アマシャム製大腸菌LM514株に実験例3−4で調製したファージを常法により感染させた後、10g/lバクトトリプトン、5g/lバクトイーストエキストラクト、10g/l塩化ナトリウム及び15g/lバクトアガーを含む寒天培地（pH7．0）に接種し、37℃で6時間培養してプラークを形成させた。寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してプラークをナイロン膜上に移取った後、ナイロン膜を剥離し、先ず、0．5M水酸化ナトリウムと1．5M塩化ナトリウムを含む水溶液に2分間、次いで、1．5M塩化ナトリウムを含む0．5Mトリス−塩酸緩衝液（pH7．0）に5分間浸漬した。ナイロン膜を5×SSCで濯ぎ、風乾後、5×SSPE、5×デンハルト溶液、0．5%（w/v）SDS及び変性サケ精子DNAを100μg/ml含む溶液に浸漬し、65℃で3時間インキュベートした。その後、ナイロン膜をアマシャム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』を用いて ^{32}P標識した実験例3−2で得たプローブ2としてのDNA断片の適量と、5×SSPE、5×デンハルト溶液、0．5%（w/v）SDS及び変性サケ精子DNAを100μg/ml含む溶液中、60℃で20時間インキュベートしてハイブリダイズさせ、以後、前記と同様にオートラジオグラフィーして、プローブ2に顕著な会合を示したファージDNAクローンを選択した。
【手続補正3】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0060
【補正方法】変更
【補正内容】
【0060】[illegible]DNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、例えば、pKK223−3、pGEX−2T、pKK[illegible]、pBTrp2 DNA、pUB110、YEp13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121などのプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核・真核生物で発現させるにはpKK223−2、pGEX−2T、pKK[illegible]、pBTrp2 DNA、pUB110、YEp13が、また、動植物細胞で発現させるにはTiプラスミド、Riプラスミド、pBI121が好適である。
【手続補正4】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】符号の説明
【補正方法】変更
【補正内容】
【符号の説明】
MGTG　cDNA　　この発明の蛋白質をコードす

るｃＤＮＡ
Ｐｔａｃ　　ｔａｃプロモータ
ＧＳＴ　　グルタチオンＳトランスフェ
ラーゼ遺伝子
Ａｍｐ　Ｒ　　アンピシリン耐性遺伝子
ｐＢＲ３２２ｏｒｉ　　大腸菌における複製開始点
【手続補正５】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図２
【補正方法】変更
【補正内容】
【図２】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	F I		技術表示箇所
C12P 21/02	ZNA	F 9282-4B			
C07K 14/57					
			A61K 37/02	ABH	
				AED	
		9281-4B	C12N 15/00	A	

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Interferon-γ production inducing protein

[Claims] 1. A protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

19,000±5,000 daltons on gel filtration and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

4.8±1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Possessing partial amino acid sequences in SEQ ID NOs:1 and 2; and

(4) Biological activity

Inducing the interferon-γ production by immunocompetent cells.

2. The protein as claimed in claim 1, which has the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:3 (where the symbol "Xaa" means "methionine" or "threonine") or a homologous amino acid sequence to the amino acid sequence.

3. A DNA encoding the protein as claimed in claim 1 or 2.

4. The DNA as claimed in claim 3, which contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

5. The DNA as claimed in claim 3 or 4, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means

of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:3.

6. The DNA as claimed in claim 3, 4 or 5, which is derived from mouse liver.

7. A replicable recombinant DNA, which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the protein of claim 1 or 2.

8. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, which contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

9. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7 or 8, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

10. The replicable recombinant DNA as claimed in claim 7, 8 or 9, wherein said vector is pGEX-2T.

11. A transformant obtainable by introducing into an appropriate host a replicable recombinant DNA which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the protein of claim 1 or 2.

12. The transformant as claimed in claim 11, which contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

13. The transformant as claimed in claim 11 or 12, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

14. The transformant as claimed in claim 11, 12 or 13,

wherein said vector is pGEX-2T.

15. The transformant as claimed in any one of claims 11 to 14, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

16. A process for preparing a protein, which comprises (a) culturing a transformant capable of forming the protein of claim 1 or 2 in a nutrient culture medium, and (b) collecting the formed protein from the resultant culture.

17. The process as claimed in claim 16, wherein said transformant is obtainable by introducing into an appropriate host a replicable recombinant DNA which contains a self-replicable vector and a DNA encoding the protein of claim 1 or 2.

18. The process as claimed in claim 16 and 17, wherein said DNA contains the base sequence containing the 5'-terminus in SEQ ID NO:4, a homologous base sequence to the base sequence, or a complementary base sequence to these base sequences.

19. The process as claimed in claim 16, 17 or 18, wherein one or more bases in SEQ ID NO:4 are replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence in SEQ ID NO:3.

20. The process as claimed in any one of claims 16 to 19, wherein said vector is pGEX-2T.

21. The process as claimed in any one of claims 16 to 20, wherein said host is a microorganism of the species *Escherichia coli*.

22. The process as claimed in any one of claims 16 to 21, wherein the protein formed in the step (a) is purified by one or more purification methods selected from the group consisting of concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography,

hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectric point electrophoresis.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a novel protein which induces the interferon-γ (hereinafter abbreviated as "IFN-γ") production by immunocompetent cells.

[Prior Art]

It is said that IFN-γ is a protein which has antiviral-, antioncotic- and immunoregulatory-activities and which is produced by immunocompetent cells stimulated with antigens or mitogens. Because of these biological activities, IFN-γ has been expected for use as an antitumor agent from the beginning of the finding, and studied energetically for clinical trials as a therapeutic agent for malignant tumors in general including brain tumors. IFN-γ preparations now commercially available are roughly classified into 2 groups, i.e. natural IFN-γs produced by immunocompetent cells and recombinant IFN-γs produced by transformants prepared by introducing DNAs which encode the natural IFN-γs into microorganisms of the species *Escherichia coli*. In the above clinical trials, either of these IFN-γs is administered to patients as an "exogenous IFN-γ".

Among these IFN-γs, the natural IFN-γ is usually produced by culturing established immunocompetent cells in nutrient culture media supplemented with IFN-γ inducers to form IFN-γ, and purifying the IFN-γ. It is known that the type of IFN-γ inducers greatly influence on the production yield and the facility of IFN-γ purification, as well as the safeness of the final products. Generally, mitogens such as concanavalin A (Con

A), *Lens culinaris*, *Phytolacca americana*, endotoxin and lipopolysaccharide are used. These mitogens, however, have problems of their molecular and quality varying dependently on their origins and purification methods, as well as the difficulty of obtaining a desired amount of preparations with a constant IFN-γ inducibility. In addition, most of these mitogens induce unfavorable side effects when administered to living bodies, and some of them even cause toxicity, so that it is substantially difficult to induce the IFN-γ production by the direct administrations to living bodies.

[Object of the Invention]

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a novel protein which induces the IFN-γ production by immunocompetent cells.

It is another object of the present invention to provide a DNA encoding the protein.

It is further object of the present invention to provide a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

It is yet another object of the present invention to provide a transformant obtainable by introducing the recombinant DNA into an appropriate host.

It is another object of the present invention to provide a process for preparing the protein by the application of the recombinant DNA technology.

[Means to Attain the Object]

The first object of the present invention is attained by a protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

19,000±5,000 daltons on gel filtration and

sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

4.8±1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Possessing partial amino acid sequences in SEQ ID NOs:1 and 2; and

(4) Biological activity

Inducing the IFN-γ production by immunocompetent cells.

The second object of the present invention is attained by a DNA which encodes the protein.

The third object of the present invention is attained by a replicable recombinant DNA which contains the DNA and a self-replicable vector.

The fourth object of the present invention is attained by a transformant obtainable by introducing the replicable recombinant DNA into an appropriate host.

The fifth object of the present invention is attained by a process for preparing the protein comprising culturing the transformant in a nutrient culture medium, and collecting the formed protein from the resultant culture.

[Function]

As is described above, the protein according to the present invention has the specific physicochemical properties, and induces the IFN-γ production when acts on immunocompetent cells.

The DNA according to the present invention expresses the production of the present protein by introducing it into an appropriate self-replicable vector to form a recombinant DNA, and introducing the recombinant DNA into a host capable of proliferat-

ing without difficulty but inherently incapable of producing the present protein.

The replicable recombinant DNA according to the present invention expresses the production of the present protein by introducing it into a host capable of proliferating without difficulty but inherently incapable of producing the present protein.

The transformant produces the protein when cultured.

When the transformant is cultured by the process according to the present invention, the present protein is formed in a desired amount with a relative easiness.

Explaining now the present invention with reference to the following experiments and examples, the present invention is based on the finding of a novel protein which induces the IFN-γ production by immunocompetent cells. During the study on cytokines produced from mammalian cells, the present inventors found the existence of a novel substance which induces the IFN-γ production in mouse liver. They isolated the substance by the combination use of purification methods comprising column chromatography mainly, studied the property and feature and revealing that the reality is a protein having the following physicochemical properties:

(1) Molecular weight

19,000±5,000 daltons on gel filtration sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(2) Isoelectric point (pI)

4.8±1.0 on chromatofocusing;

(3) Partial amino acid sequence

Possessing partial amino acid sequences in

SEQ ID NOs.1 and 2, and

(4) Biological activity

Inducing the interferon-γ production by immunocompetent cells.

The experiments conducted to reveal the physicochemical properties are explained in the below:

Experiment 1

Preparation of purified protein

To 600 8-week-old female CD-1 mice was intraperitonealy injected one mg/mouse of dead *Corynebacterium parvum* (ATCC 11827) which had been obtained by preheating at 60°C for one hour, and the mice were fed in usual manner for 7 days and intravenously injected with one μg/mouse of a purified lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli*. On 1-2 hours after the intravenous injection, the mice were sacrificed by dislocating their cervical vertebrae to collect their blood from hearts, followed by removing their livers, disrupting them by a homogenizer in 8-fold volumes of 50 mM phosphate buffer (pH 7.3), and extracting the resultant. The resultant extract was centrifuged at about 8,000 rpm for 20 min, and an about 9 L of the resultant supernatant was admixed with a saturated ammonium sulfate in 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) to give a saturation degree of 45 w/v %. The resultant solution was allowed to stand at 4°C for 18 hours and centrifuged at about 8,000 rpm for 30 min to obtain a 19 L supernatant containing the present protein.

The supernatant was fed to a column packed with about 4.6 L of "PHENYL SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB, Uppsala Sweden, which had been equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) containing one M ammonium sulfate, and the column was washed with a fresh preparation of the same buffer, and fed at an

SV (space velocity) 0.57 with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) having a linear gradient of ammonium sulfate ranging from 1 M to 0.2 M. Fractions containing the present protein eluted at 0.8 M ammonium sulfate were collected and pooled into an about 4.8 L solution which was then concentrated with a membrane filter, dialyzed against 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C for 18 hours, and fed to a column packed with about 250 ml of "DEAE-SEPHAROSE", a product of Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden. The column was washed with a fresh preparation of the same buffer and fed at an SV 0.13 with 20 mM phosphate buffer (pH 6.5) with a linear gradient of sodium chloride ranging from 0 M to 0.2 M to elute the present protein at a concentration of about 0.13 M sodium chloride.

Fractions containing the present protein were collected, pooled (about 260 ml), concentrated and dialyzed against 25 mM Bis-Tris buffer (pH 7.1) at 4°C for 18 hours. The dialyzed solution was applied to a column packed with about 24 ml of "MONO-P", a product of Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, and eluted with 10 v/v % polybuffer 74 (pH 4.0) while decreasing the pH from 7 to 4 to obtain an about 23 ml eluate containing the present protein. The eluate was concentrated, fed to a column packed with "SUPER-DEX 75", a product of Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with a solution containing 7 mM disodium hydrogen phosphate, 3 mM sodium dihydrogen phosphate, and 139 mM sodium chloride, and eluted with a fresh preparation of the same solution on gel filtration chromatography to obtain fractions containing the present protein, eluted at fractions corresponding to about 19,000 daltons. The fractions were pooled and concentrated for use in Experiment 2. The yield of the present protein was about 0.6 μg/mouse.

Experiment 2

Physicochemical property of protein

Experiment 2-1

Molecular weight

In accordance with the method reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol.227, pp.680-685 (1970), the purified protein prepared by the method in Experiment 1 was electrophoresed in a sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel free of reducing agent to mainly show a single protein band with an IFN-γ inducing activity at a position corresponding to about 19,000±5,000 daltons. The marker proteins used in this experiment were calf serum albumin (MW=67,000 daltons), ovalbumin (MW=45,000 daltons), soy bean trypsin inhibitor (MW=20,100 daltons), and α-lactalbumin (MW=14,400 daltons).

Experiment 2-2

Isoelectric point

The purified protein in Experiment 1 was chromatofocused to give an isoelectric point of about 4.8±1.0.

Experiment 2-3

Partial amino acid sequence

A portion of an aqueous solution containing the purified protein in Experiment 1 was concentrated up to a volume of about 50 µl which was then admixed with 25 µl of a solution containing 3 w/v % SDS, 60 v/v % glycerol, and 60 mg/ml dithiothreitol. The resultant mixture was incubated at 50°C for 30 min, positioned on 15 w/v % polyacrylamide gel, and electrophoresed in usual manner. The resultant gel was stained by soaking the gel in a mixture solution of 10 v/v % aqueous acetic acid solution and 50 v/v % aqueous methanol solution containing 0.1 w/v % coomassie brilliant blue R 250, destained by repeatedly washing the gel with a mixture

solution of 12 v/v % aqueous methanol solution and 7 v/v % aqueous acetic acid solution, and washed by soaking it in distilled water for 18 hours. A portion, which was stained with the coomassie brilliant blue and contained the present protein, was cut out of the gel, and lyophilized.

The lyophilized gel was soaked in 0.6 ml aqueous solution consisting of 100 mM sodium hydrogen carbonate containing 2 μg/ml "TPCK TRYPSIN", 0.5 mM calcium chloride, and 0.02 v/v % aqueous Tween 20 solution, followed by the incubation at 37°C for 18 hours to trypsinize the protein. The resultant was centrifuged to obtain a supernatant, while the resultant precipitate was soaked in one ml of one v/v % aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v % Tween 20, shook for 4 hours at ambient temperature, and centrifuged to obtain a supernatant. The newly formed precipitate was successively treated similarly as above with 70 v/v aqueous trifluoroacetate containing 0.001 v/v Tween 20 and with 50 v/v % aqueous acetonitrile to obtain a supernatant. The resultant supernatant and the supernatant already obtained in the above were pooled and concentrated up to 250 μl, and the concentrate was centrifugally filtered.

The resultant aqueous solution containing peptide fragments was fed to "HPLC ODS-120T", a column for HPLC commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, which had been previously equilibrated with 0.1 v/v aqueous trifluoroacetate, and the column was washed with 0.1 v/v % aqueous trifluoro acetate, and fed with 0.1 v/v % trifluoro acetate at a flow rate of 0.5 ml/min while the concentration of aqueous acetonitrile was increasing from 0 v/v % to 70 v/v % and the concentration of peptide in the eluate was monitoring by a spectrophotometer at wave lengths of 214 nm and 280 nm. Fractions eluted about 75 min

and about 55 min after the initiation of the elution were respectively collected (hereinafter named "**peptide fragment A**" and "**peptide fragment B**"). The elution pattern was in FIG. 1.

The peptide fragments A and B were analyzed on "MODEL 473 A", a protein sequencer commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and revealing that they have the amino acid sequences in SEQ ID NOs:1 and 2.

Experiment 2-4

Biological activity

Experiment 2-4(a)

Induction of the IFN-γ production by immunocompetent cell

BDF1 Female mouse spleen, 8-week-old, was extracted and dispersed in serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4), and the cells were washed with a fresh preparation of the same medium, and soaked in Gei buffer (pH 8.0) to hemolyze. The resultant spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum to give a cell density of $1x10^7$ cells/ml, fed to a cell-separatory nylon wool column commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, and incubated in an incubator at 37°C for an hour under 5 v/v % CO_2 conditions. Thereafter, T-cells were collected from the column by feeding to the column with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum, and washed with a fresh preparation of the same buffer. The resultant cells were used in the following experiment for IFN-γ induction.

0.15 ml aliquots of a mouse T-cell suspension in RPMI 1640 medium (pH 7.4) with a cell density of $1x10^7$ cells/ml were injected into 96-well microplates, and to each well was added a present purified protein, which had been diluted with 0.05 ml RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % calf serum

albumin. The cells in the microplates were incubated in the presence or in the absence of 0.5 μg/ml concanavalin A in an incubator at 37°C for 24 hours under 5 v/v % CO_2 conditions. From each well 0.1 ml of the culture supernatant was collected and assayed for IFN-γ production level by conventional enzyme immunoassay (EIA). As a control, a sample free of the present purified protein was provided and treated similarly as above. The standard mouse IFN-γ preparation Gg02-901-533, obtained from The National Institutes of Health, USA, was used as an IFN-γ standard in this experiment, and the activity was expressed in terms of international units (IU).

As a result, no significant IFN-γ production was found with the control sample but found with the test sample: The present protein induced about 2-2,000 IU IFN-γ and about 2-200 IU IFN-γ from $1x10^6$ mouse T-cells when the T-cells were respectively incubated with and without 0.02-10 μg/ml of concanavalin A. The results confirm that the present protein has an activity of inducing the IFN-γ induction by immunocompetent cells.

Throughout the present specification, one unit activity of the present protein is defined as an amount of which induces 160 IU IFN-γ production when tested in the presence of concanavalin A.

Experiment 2-4(b)

Augmentation of cytotoxicity of killer cell

Similarly as in Experiment 2-4(a) mouse spleen cells were suspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2) containing 100 μg/ml kanamycin, $5x10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol, and 10 v/v % calf serum to give a cell density of $1x10^7$ cells/ml. The cell suspension was mixed with 0, 1, 5 or 10 units/ml of a recombinant human interleukin 2, placed in a 25-ml culture flask, admixed with 0,

0.8, 4, 20 or 100 units/ml of the purified protein, and incubated in an incubator at 37°C for 72 hours under 5 v/v % CO_2 conditions. Thereafter, the resultant cells were washed with a fresh preparation of the same RPMI 1640 medium (pH 7.2), and suspended together with YAC-1 cells (ATCC TIB160), which were previously labeled with radioactive sodium chromate, to give a cell ratio of 20/1 or 40/1 (effective cells/target cells) in a fresh preparation of the same RPMI 1640 medium (pH 7.2). The cell suspension was poured in 96-well microplates and incubated in an incubator at 37°C for 4 hours under 5 v/v % CO_2 conditions, followed by determining the radioactivity of ^{51}Cr in the resultant supernatant by a γ-ray counter. The results were in Table 1.

The results in Table 1 show that the present protein has an activity of inducing the cytotoxicity of killer cells, and the activity is augmented by interleukin 2.

Table 1

Factor		Cytotoxicity (%)	
The present protein (unit/ml)	Interleukin 2 (unit/ml)	Ratio (Effective cells/Target cells)	
		40/1	20/1
100	0	48.6	46.0
20	0	35.5	27.5
4	0	33.0	17.7
0.8	0	22.9	14.5
0	0	0.1	0.0
100	1	55.8	45.2
20	1	54.2	46.4
4	1	40.5	26.4

0.8	1	22.1	10.3
0	1	0.4	0.0
100	5	63.6	59.1
20	5	62.2	49.1
4	5	56.2	44.6
0.8	5	38.4	23.4
0	5	1.0	0.2
100	10	67.8	56.5
20	10	67.7	59.9
4	10	62.8	54.1
0.8	10	46.2	31.7
0	10	1.0	0.5

No protein having the above identified physicochemical properties has been known, and this confirms that it is a novel protein. The present inventors isolated mRNA from mouse liver cells, collected a DNA fragment which partially encodes the present protein by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of a primer which was chemically synthesized by using the mRNA as a template based on the partial amino acid sequence revealed in Experiment 2-3, and energetically studied a cDNA library, prepared from the mRNA by using the DNA fragment as a probe, to obtain a DNA fragment in SEQ ID NO:4 which contains the 5'-terminus and consists of 471 base pairs. The decoding of the base sequence revealed that the present protein contains an amino acid sequence in SEQ ID NO:3 which consists of 157 amino acids and contains the N-terminal. In SEQ ID NO:3 the symbol "**Xaa**" as an amino acid means "**Met** (methionine)" or "**Thr** (threonine)".

The sequential techniques used to reveal the amino acid sequence and base sequence in SEQ ID NOs:3 and 4 are summarized in the below:

(1) The present protein is isolated from mouse liver cells and highly purified by combining conventional purification methods comprising chromatography as a main technique;

(2) The resultant purified protein was digested with trypsin, and 2 polypeptide fragments were isolated from the resultant mixture and determined for amino acid sequence;

(3) From mouse liver cells, mRNA was collected, and a DNA fragment which partially encodes the present protein was prepared by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the presence of a primer which was chemically synthesized by using the mRNA as a template based on the partial amino acid sequences revealed in the above. The DNA fragments were screened by using an oligonucleotide as a probe which had been chemically synthesized based on these partial amino acid sequences, followed by collecting a DNA fragment which partially encodes the present protein;

(4) A cDNA library was prepared with the mRNA as a template and hybridized with the DNA fragment as a probe, followed by collecting a transformant which strongly hybridized with the DNA fragment; and

(5) A cDNA was isolated from the transformant, and the

base sequence was determined and decoded. The comparison of the decoded amino acid sequence and the partial amino acid sequence revealed that the base sequence encodes the present protein.

The following Experiment 3 is to explain the above techniques (3) to (5), and the techniques in themselves used therein are commonly known in the art, for example, those disclosed by J. Sumbrook et al. in "*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*", 2nd edition (1989), published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, and by Masami MURAMATSU in "*Rabo-Manual for Genetic Technology*" (1988), published by Maruzen Co., Ltd., Tokyo, Japan.

Experiment 3

Base sequence of DNA and amino acid sequence of protein

Experiment 3-1

Preparation of whole RNA

Three g of wet mouse liver cells, similarly prepared by the method in Experiment 1, was weighed, soaked in 20 ml of a mixture solution containing 6 M guanidine isothiocyanate, 10 mM sodium citrate, and 0.5 w/v SDS, and disrupted with a homogenizer. 35-ml centrifugation tubes were injected with 25 ml of 0.1 M EDTA (pH 7.5) containing 5.7 M cesium chloride, and 10 ml of the homogenized cells were overlaid on the upper part of the solutions in the tubes, followed by centrifuging the tubes at 25,000 rpm for 20 hours to collect RNA fractions. The fractions were pooled, distributed into 15-ml centrifugation tubes, and mixed with equal volumes of a mixture solution of chloroform and isobutanol (= 4:1 by volume). The tubes were vibrated for 5 min and centrifuged at 4°C and at 10,000 rpm for 10 min, and the formed water layers were

collected, pooled, mixed with 2.5-fold volumes of ethanol, and allowed to stand at -20°C for 2 hours to precipitate the whole RNAs. The precipitate was collected, pooled, washed with 75 v/v % aqueous ethanol solution, and dissolved in 0.5 ml of sterilized distilled-water for use in the following experiment. The yield of the RNAs was about 4 mg on a dry solid basis (d.s.b.).

Experiment 3-2

Preparation of DNA fragments encoding partially the present protein

One µg of the whole RNAs in Experiment 3-1 was mixed with 4 µl of 25 mM magnesium chloride, 2 µl of a solution of 10xPCR buffer consisting of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) and 500 mM potassium chloride, 8 µl of one mM dNTP mix, one µl of a solution containing one unit/µl RNase inhibitor, one µl of a solution containing 2.5 units/µl reverse transcriptase, and one µl of 2.5 µM random hexamer, and further mixed with sterilized distilled-water to give a total volume of 20 µl. The mixture solution was placed in 0.5 ml reaction tubes, and, in usual manner, successively incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 30 min, at 99°C for 5 min, and at 5°C for 5 min to effect the reverse transcriptase reaction, followed by recovering an aqueous solution containing the first strand cDNA.

To 20 µl of the aqueous solution were added 4 µl of 25 mM magnesium chloride, 8 µl of 10xPCR buffer, 0.5 µl of a solution containing 2.5 units/µl of AmpliTaq DNA polymerase commercialized by Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA, and one pmole of primer 1 or 2 as a sense primer or an anti-sense primer. The mixture solution was volumed up to 100 µl with sterilized distilled-water, and, in usual manner, successively incubated at 94°C for one min, at 45°C for 2 min, and at 72°C for 3 min in a

cyclic manner for 40 cycles to amplify a DNA fragment, which partially encodes the present protein, by using the first strand cDNA as a template. The primers 1 and 2 are oligonucleotides, which were chemically synthesized based on the amino acid sequences of Pro-Glu-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile and Phe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ile in SEQ ID NOs:1 and 2, have base sequences of 5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3' and 5'-TTYGARGAYATGACNGAYA T-3', respectively.

A portion of the resultant PCR product was fractionated on electrophoresis in 2 w/v % agarose gel, transferred onto a nylon film, fixed with 0.4 N sodium hydroxide, washed with 2xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhard's solution, 0.5 w/v % SDS and 100 μg/ml of denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. An oligonucleotide as a probe 1 having a base sequence of 5'-TTYGARGARATGGAYCC-3' was synthesized based on the amino acid sequence of Phe-Glu-Glu-Met-Asp-Pro in SEQ ID NO:1, and labeled with [γ-^{32}P]ATP and T4 polynucleotide kinase. The nylon film was soaked in a solution containing one pmole of the probe 1, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μg/ml of a denatured salmon sperm DNA, and incubated at 45°C for 24 hours to effect hybridization. The resultant nylon film was washed with 6xSSC and autoradiographed in usual manner and revealing that the PCR product contained the objective DNA fragment.

The remaining PCR product was mixed with "pT7 BLUE T", a plasmid vector commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, an adequate amount of T4 ligase, and further mixed with 100 mM ATP up to give a concentration of one mM, followed by the incubation at 16°C for 18 hours to insert the DNA fragment into the plasmid vector. The recombinant DNA thus obtained was

introduced into *Escherichia coli* NovaBlue Strain, a microorganism of the species *Escherichia coli* commercialized by Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, to obtain a transformant which was then inoculated into a medium plate containing 10 g/l bactotryptone, 2.5 g/l sodium chloride, 15g/l bacto-agar, 100 mg/l ampicillin, 40 mg/l X-Gal and 23.8 mg/l isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside (hereinafter abbreviated as "IPTG"), and incubated at 37°C for 24 hours to form colonies. A nylon film was in usual manner positioned on a medium plate and allowed to stand for about 30 seconds to attach the colonies thereunto. The nylon film was then detached from the medium plate and soaked for 7 min in a solution containing 0.5 N sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride to effect cell lysis. Thereafter, the nylon film was soaked for 3 min in 1.5 M sodium chloride in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.2), washed with 2xSSC, soaked in 0.4 N sodium hydroxide for 20 min to fix the DNA, washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a prehybridization solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. The colonies on the nylon film were in usual manner hybridized with the probe 1, washed with 6xSSC, and autoradiographed similarly as above, followed by selecting from the medium plate transformants which strongly hybridized with the probe 1.

The transformants were inoculated in L-broth (pH 7.2) containing 100 μg/ml ampicillin and incubated at 37°C for 18 hours, followed by collecting cells from the culture and collecting recombinant DNA by conventional SDS-alkali method. The analysis of the dideoxy method revealed that the recombinant DNA contained a DNA fragment consisting of base sequences which correspond to those at positions from 85 to 281 in SEQ ID NO:4.

Experiment 3-3

Preparation of mRNA

0.05 ml of an aqueous solution containing the whole RNAs in Experiment 3-1 was placed in a test tube, admixed with 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing one mM EDTA and 0.1 w/v % SDS, and volumed up to one ml with sterilized distilled-water. To the mixture was added one ml "OLIGOTEX-dT30 SUPER", an oligo-d$(T)_{30}$ latex commercialized by Nippon Roche K.K., Tokyo, Japan, followed by the incubation at 65°C for 5 min to denature the RNAs and the cooling for 3 min in an ice-chilled bath. The resultant mixture was admixed with 0.2 ml of 5 M sodium chloride, incubated at 37°C for 10 min, and centrifuged at 10,000 rpm at 25°C for 10 min. The precipitate in the form of a pellet was suspended in 0.5 ml sterilized distilled-water, and incubated at 65°C for 5 min to extract mRNA from the oligo-d$(T)_{30}$ latex. The yield of the mRNA was about 5 μg.

Experiment 3-4

Preparation of cDNA library

cDNA Library was prepared from the mRNA in Experiment 3-3 by using "cDNA SYNTHESIZING SYSTEM PLUS", a cDNA cloning kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA. The procedures were as follows: To 1.5-ml reaction tube were successively added 4 μl of a solution for synthesizing the first strand cDNA, one μl sodium pyrophosphate solution, one μl of a solution of human placenta ribonuclease inhibitor, 2 μl deoxynucleotide triphosphate mix, and one μl oligo-dT primer. The resultant mixture was mixed with 2 μl of mRNA in Experiment 3-3, volumed up to 19 μl with sterilized distilled-water, mixed with one μl of a solution containing 20 units of reverse transcriptase, and incubated at 42°C for 40 min

to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

The mixture thus obtained was mixed with 37.5 µl of a solution for synthesizing the second strand cDNA, 0.8 units of ribonuclease H derived from *Escherichia coli*, and 23 units of DNA polymerase, and volumed up to 100 µl with sterilized distilled-water. The resultant mixture was successively incubated at 12°C for 60 min and at 22°C for 60 min, mixed with 2 units of T4 DNA polymerase, and incubated at 37°C for 10 min to obtain a reaction mixture containing the second strand cDNA. To the reaction mixture was added 4 µl of 0.25 M EDTA (pH 8.0) to suspend the reaction, and the resultant was in usual manner extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective cDNA, followed by recovering the precipitate.

To the cDNA thus obtained were added 2 µl of L/K buffer, 250 pmole *Eco* RI adaptor, and 2.5 units of T4 DNA ligase in this order, and the resultant solution was volumed up to 20 µl with sterilized distilled-water, and incubated at 15°C for 16 hours to ligate the *Eco* RI adaptor to the both ends of the cDNA. The reaction mixture was mixed with 2 µl of 0.25 M EDTA to inactivate the remaining enzyme, and subjected to molecular sieve chromatography to remove intact *Eco* RI adaptor. To the resultant were added 40 µl of L/K buffer and 80 units of T4 polynucleotide kinase, and the mixture was volumed up to 400 µl with sterilized distilled-water, followed by the incubation at 37°C for 30 min to methylate the *Eco* RI cleavage sites. The resultant mixture was extracted with phenol and chloroform and treated with ethanol to precipitate the objective DNA, followed by recovering the DNA. To the DNA were added 1.5 µl of L/K buffer containing an adequate amount of λgt 10 arms, and 2.5 units of T4 DNA ligase, and the resultant solution was volumed up to 15 µl with sterilized

distilled-water, incubated at 15°C for 15 hours to effect ligation, and subjected to conventional *in vitro* packaging method to obtain a phage containing a recombinant λDNA.

Experiment 3-5

Cloning of recombinant DNA

A seed culture of *Escherichia coli* NM514 strain was in usual manner infected with the phage in Experiment 3-4, and the infected cells were inoculated in an agar plate (pH 7.0) containing 10 g/l bactotrypton, 5 g/l bacto-yeast extract, 10 g/l sodium chloride and 15 g/l bacto-agar, and incubated at 37°C for 6 hours to form plaques. The agar plate was covered with a nylon film and allowed to stand for about 30 seconds to attach the plaques thereunto. The nylon film was detached from the plate, and successively soaked in an aqueous solution containing 0.5 M sodium hydroxide and 1.5 M sodium chloride for 2 min and in 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1.5 M sodium chloride for 5 min. The nylon film was washed with 5xSSC, air-dried, soaked in a solution containing 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA, and incubated at 65°C for 3 hours. Thereafter, the resultant nylon film was incubated in a solution containing an adequate amount of DNA fragment as a probe 2 obtained in Experiment 3-2 and labeled with ^{32}P by "READY PRIME DNA LABELLING SYSTEM", a DNA labeling kit commercialized by Amersham Corp., Div., Amersham International, Arlington Heights, USA, 5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5 w/v % SDS, and 100 μg/ml of denatured salmon sperm DNA, and the mixture was incubated at 60°C for 20 hours to effect hybridization. The resultant was subjected to autoradiography similarly as above to select phage DNA clones which strongly hybridized with the probe 2.

With conventional techniques, the clones were amplified in *Escherichia coli*, followed by the extraction of a recombinant DNA from the cells. The recombinant DNA was cleaved with *Eco* RI, a restriction enzyme. Plasmid vector pUC19 (ATCC 37254) was cleaved with the same restriction enzyme, and the resultant cleaved DNA fragments and plasmid fragments were ligated with DNA ligase to obtain a recombinant DNA which was then introduced into *Escherichia coli* JM109 (ATCC 53323) by conventional competent cell method to obtain a transformant.

Experiment 3-6

Determination of base sequence and amino acid sequence

The transformant in Experiment 3-5 was inoculated into L-broth (pH 7.2) and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The resultant proliferated cells were collected and treated with conventional SDS-alkali method to obtain a recombinant DNA containing the DNA according to the present invention. The analysis on an automatic sequencer using a fluorophotometer revealed that the recombinant DNA contains the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:5. The decoding of the base sequence indicated that it encodes the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:5. The amino acid sequence contains the partial amino acid sequences in SEQ ID NOs:1 and 2 corresponding to those at positions from 79 to 103 and from 26 to 43 in SEQ ID NO:5, and this means that the present protein contains the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:3, and that it is encoded by a DNA containing the base sequence from the 5'-terminus in SEQ ID NO:4.

As is described above, the present inventors have found the present protein, which induces IFN-γ production by immunocompetent cells, through their long term research. Unlike

conventional proteins, the present protein has specific physicochemical properties. The present invention is to provide the protein by applying the recombinant DNA technology. The present protein and its preparation will be described in detail with reference to the following Examples.

The protein according to the present invention means proteins in general which have specific physicochemical properties and those derived from natural sources, as well as those prepared by the recombinant DNA technology. The present protein generally has a partially or totally revealed amino acid sequence, for example, the amino acid sequence containing the N-terminal in SEQ ID NO:3 and its homologous amino acid sequences. Variants, which have complementary amino acid sequences to the one in SEQ ID NO:3, can be obtained by replacing one or more amino acids in SEQ ID NO:3 with other amino acids without alternating the inherent biological properties of the present protein. Even when used the same DNA and depending on hosts into which the DNA is introduced, as well as on the components and the conditions of cultivation temperature and pH for culturing transformants containing the DNA, it may be formed variants which are defective in or additionally contain one or more amino acids near to the N-terminal in SEQ ID NO:3, but have the inherent biological properties of the protein through the modification by internal enzymes of the hosts after the DNA expression. The present protein includes such variants as long as they induce the IFN-γ production by immunocompetent cells.

The present protein can be prepared by culturing in nutrient culture media transformants with DNAs encoding the protein, and collecting the formed protein from the resultant cultures. The transformants usable in the present invention can

be obtained by introducing into appropriate hosts DNAs having the base sequence of SEQ ID NO:4, homologous base sequences to it, and complementary ones to these base sequences. One or more bases in those base sequences can be replaced with other bases by means of the degeneracy of genetic code without alternating the amino acid sequence of the present protein. To express the production of the protein in hosts by such DNAs, one or more bases in base sequences which encode the present protein or its variants can be replaced with other bases.

Any DNA can be used in the present invention as long as it has one of those base sequences independently of their origin, i.e. those from natural sources or those prepared by chemical synthesis. The natural sources include, for example, mouse liver cells from which the gene containing the present DNA is obtainable. The preparation procedure is as follows: Remove mouse liver previously challenged with stimulants such as *Corynebacterium parvum*, BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*, mitogen and lipopolysaccharide, disrupt the liver cells, and isolate the whole DNAs from the resultant suspension. Treat the DNAs with oligo-dT cellulose or oligo-dT latex to obtain poly (A)'RNA, and fractionate it using a sucrose density gradient buffer to isolate mRNA. Allow a reverse transcriptase and a polymerase to act on the mRNA as a template to form double-stranded cDNA, introduce the cDNA into an appropriate self-replicable vector, and introduce the resultant recombinant DNA into an appropriate host such as *Escherichia coli*. Culture the resultant transformant in a nutrient culture medium, and collect the proliferated cells containing the DNA encoding the present protein by the colony hybridization method. The DNA according to the present invention is obtainable by treating the transformants with conventional

methods. To artificially produce the present DNA, for example, it is prepared by the chemical synthesis based on the base sequence in SEQ ID NO:4, or by introducing a DNA which encodes the amino acid sequence in SEQ ID NO:3 into an appropriate vector to form a recombinant DNA, introducing the recombinant DNA into an appropriate host, culturing the resultant transformant in a nutrient culture medium, isolating the proliferated cells from the culture, and collecting plasmids containing the objective DNA from the cells.

The DNA was generally introduced into hosts in the form of a recombinant DNA. Such a recombinant DNA usually contains the DNA and a self-replicable vector, and it can be readily prepared by the recombinant DNA technology in general if only the DNA is in hand. Examples of such self-replicable vector are plasmid vectors such as pKK223-2, pGEX-2T, pRL-λ, pBTrp2 DNA, pUB110, YEp13, Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121. Among these vectors, pKK223-2, pGEX-2T, pRL-λ, pBTrp2 DNA, pUB110 and YEp13 are suitably used when the present DNA is expressed in procaryotes such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, while Ti plasmid, Ri plasmid and pBI121 are suitably used for the expression in animal and plant cells.

To introduce the present DNA into these vectors, conventional methods used in this field can be arbitrarily used: Genes containing the present DNA and self-replicable vectors are cleaved with restriction enzymes and/or ultrasonic, and the resultant DNA fragments and vector fragments are ligated. To cleave genes and vectors, the use of restriction enzymes, which specifically act on nucleotides, more particularly, type II restriction enzymes such as *Sau* 3AI, *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI, *Sal*

I, *Xba* I, *Sac* I and *Pst* I, facilitates the ligation of DNA fragments and vector fragments. To ligate DNA fragments and vector fragments, they are, if necessary, first annealed, then treated with a DNA ligase *in vivo* or *in vitro*. The recombinant DNAs thus obtained can be readily introduced into appropriate hosts, and this enables the limitless replication of the DNAs by culturing the transformants.

The recombinant DNAs usable in the present invention can be introduced into appropriate hosts such as yeasts and other microorganisms of the species *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: When microorganisms of the species *Escherichia coli* are used as a host, they are cultured in the presence of recombinant DNAs and calcium ions, and the competent cell method and the protoplast method are used when microorganisms of the species *Bacillus subtilis* are used as a host. To clone the objective transformants, they are selected by the colony hybridization method or by culturing all the transformants in nutrient culture media, and selecting those which produce proteins capable of inducing immunocompetent cells to produce IFN-γ.

The transformants thus obtained produce the present protein intracellularly or extracellularly when cultured in nutrient culture media. Examples of such nutrient culture media are those in the form of liquid in general which contain carbon sources, nitrogen sources and minerals, as well as amino acids and/or vitamins as a micronutrient. The carbon sources usable in the present invention include saccharides such as starch, starch hydrolysates, glucose, fructose and sucrose. The nitrogen sources usable in the present invention include nitrogen containing organic- and inorganic-compounds such as ammonia and their salts,

urea, nitrates, peptone, yeast extract, defatted soy bean, corn steep liquor, and beef extract. Transformants are inoculated into nutrient culture media and incubated at a temperature of 25-65°C and at a pH of 2-8 for about 1-10 days under aerobic conditions by the agitation-aeration method, etc., to obtain cultures containing the present protein. Although the cultures can be used intact as an IFN-γ inducer, they are, if necessary, subjected to ultrasonication and/or cell lysis enzymes to disrupt cells, followed by filtering or centrifuging the resultant suspensions to remove intact cells and cell debris, and further purifying the resultant supernatants containing the present protein. The purification methods usable in the present invention are, for example, those which are generally used in this field to purify biologically active substances, i.e. concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectric point electrophoresis, and, if necessary, two or more of them can be used in combination. The resultant purified solutions containing the present protein can be concentrated and/or lyophilized into liquids or solids to meet to final uses.

As is described above, the present protein has an activity of inducing IFN-γ production by immunocompetent cells. Because of this, the present protein can be arbitrarily used as therapeutic and/or prophylactic agents, for example, those for virus diseases such as AIDS and condyloma acuminatum; malignant tumors such as renal cancer, granuloma, mycosis fungoides and cerebral tumor; and immune disorders such as articular rheumatism and allergy.

The present protein is allowed to coexist in nutrient

culture media to induce the IFN-γ production by immunocompetent cells, or directly administered to mammals for the treatment and/or prevention of IFN-γ susceptive diseases. In the former, leukocytes separated from peripheral blood of mammals, or established immunocompetent cells such as HBL-38 cells, MO cells, Jurkat cells, EL-4 cells and L12-R4 cells are suspended in nutrient culture media containing the present protein to induce the IFN-γ production. If necessary, such nutrient culture media can be supplemented with T-cell stimulants such as mitogen, interleukin 2, and anti-CD 3 antibody, and the cells are cultured at 30-40°C and at a pH of about 5-8 for about 1-100 hours while the media were replacing with fresh ones. IFN-γ can be obtained from the resultant cultures by one or more conventional methods in general used for purifying biologically active substances, for example, concentration, salting out, dialysis, separatory sedimentation, gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, chromatofocusing, gel electrophoresis, and isoelectric point electrophoresis.

To treat and/or prevent IFN-γ susceptive diseases, the present IFN-γ inducing agent is directly administered to mammals: For example, IFN-γ inducing agents are orally administered to mammals after formulated into appropriate forms, or injected to the mammals intradermally, subcutaneously, muscularly, intravenously and peritoneally. The mammals, which can be administered with the present protein, are not restricted to human, and include other animals such as mouse, rat, hamster, rabbit, dog, cat, caw, horse, coat, sheep, pig and monkey. Since the present protein has a strong IFN-γ inducibility and an extremely-low toxicity, it readily induces the IFN-γ production with only a small amount without causing serious side effects even

when administered to in a relatively-large amount. Thus, the present protein advantageously induces the desired amount of IFN-γ production smoothly without strict control of the administration.

The present protein has a feature of strongly augmenting the cytotoxicity of killer cells, and, when used in combination with interleukin 2 and/or tumor necrosis factor (TNF), it exerts a strong effect on the therapeutic effect and/or the reduction of side effects in the treatment of adoptive immunotherapy for malignant tumors including solid carcinomas such as lung cancer, renal cancer and breast cancer.

The preparation of the present protein using the transformants will be explained in detail with reference to the following Examples:

Example 1

Replicable recombinant DNA and transformant

The first strand cDNA was prepared from the whole RNAs in Experiment 3-1 by using "GeneAmp RNA PCR Kit", a PCR kit commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan. The procedures were as follows: To a 0.5-ml reaction tube were added 4 μl of 25 mM magnesium chloride, 2 μl of 10xPCR buffer, 8 μl of one mM dNTP mix, one μl of one unit/μl RNase inhibitor, one μl of 2.5 units/μl of reverse transcriptase, one μl of 2.5 μM random hexamer, and one μl of the whole RNAs in Experiment 3-1, and the mixture was volumed up to 20 μl with sterilized distilled-water. The resultant mixture was successively incubated at 25°C for 10 min, at 42°C for 30 min, at 99°C for 5 min, and at 5°C for 5 min to obtain a reaction mixture containing the first strand cDNA.

Twenty μl of the reaction mixture was mixed with 4 μl of 25 mM magnesium chloride, 8 μl of 10xPCR buffer, 0.5 μl of 2.5 units/μl of AmpliTaq DNA polymerase, and adequate amounts of sense

primer and anti-sense primer as shown by the base sequences of 5' CGAGGGATCGAACTTTGGCCGACTTC-3' and 5'-CGAGGAATTCCTAACTTTGATGTAAG-3' which were chemically synthesized based on the amino acid sequences near to the N- and C-terminals in SEQ ID NO:3, and the resultant mixture was volumed up to 100 µl with sterilized distilled-water. The mixture was in usual manner successively incubated at 94°C for one min, at 55°C for 2 min, and at 72°C for 3 min, and the successive incubation was repeated 40 cycles. The resultant PCR product was cleaved with *Bam* HI and *Eco* RI as a restriction enzyme to obtain a *Bam* HI-*Echo* RI DNA fragment.

To an adequate amount of sterilized distilled-water were added 100 ng of the fragment, 10 ng of "pGEX-2T", a plasmid vector commercialized by Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, which had been cleaved with *Bam* HI and *Echo* RI as a restriction enzyme, an adequate amount of T4 DNA ligase, and 10 mM ATP in an amount of which gives the final concentration of one mM, followed by incubating the mixture solution at 16°C for 18 hours. The recombinant DNA thus obtained was introduced into *Escherichia coli* DH5 strain (ATCC 53868) to obtain a transformant which was then inoculated into L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/l of ampicillin, followed by the incubation at 37°C for 18 hours and extracting the objective recombinant DNA by conventional SDS-alkali method.

The recombinant DNA was named "**pMGTG-1**" and analyzed for structure on the dideoxy chain termination method and revealing that, as is shown in FIG.2, in pMGTG-1, MGTG cDNA which has the base sequence of SEQ ID NO:4 is positioned in the downstream of the Tac promotor and the gene for glutathione S transferase.

Example 2

Preparation of protein by transformant

A transformant obtained by the method in Example 1 was

inoculated in L-broth (pH 7.2) containing 50 μg/ml of ampicillin, and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. One v/v % of the proliferated transformants as a seed was inoculated into 18 L of a fresh preparation of the same medium, and cultured at 37°C under aeration-agitation conditions until the absorbance (A_{650}) of the culture reached to about 0.6, followed by adding IPTG to the culture to give a concentration of one mM. Thereafter, the resultant culture was incubated for 5 hours and centrifuged to separate cells which were then suspended in a mixture solution (pH 7.3) containing 150 mM sodium chloride, 16 mM disodium hydrogen phosphate, and 4 mM sodium dihydrogen phosphate, treated in usual manner with ultrasonication, and centrifuged to remove cell debris to obtain a supernatant.

The supernatant was fed to a column packed with "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B", a gel commercialized by Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) supplemented with 150 mM sodium chloride, and the column was washed with a fresh preparation of the same buffer and fed with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) supplemented with 5 mM reducing glutathione to elute proteins. Fractions containing proteins were pooled, mixed with calcium chloride to give a concentration of 2.5 mM together with 1,000 units of thrombin, and incubated at 25°C for 18 hours. The reaction mixture was fed to a column packed with "GLUTATHIONE SEPHAROSE 4B", which had been equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) supplemented with 150 mM sodium chloride, followed by recovering non-adsorbed fractions. Thereafter, the fractions were pooled, concentrated, lyophilized to obtain a solid preparation containing the present protein with a specific activity of about 5×10^5 units/mg protein in a yield of about 3 mg per one L of the culture.

Similarly as in Experiment 2, the purified protein was studied on the physicochemical properties and revealing that it has a molecular weight of 19,000±5,000 daltons on gel filtration and SDS-PAGE, and a pI of 4.8±1.0 on chromatofocusing. The testing by the method in Experiment 2-4 revealed that the purified protein effectively induces the IFN-γ production by immunocompetent cells independently of the presence of concanavalin A (Con A), and strongly augments the cytotoxicity of killer cells. This is an evidence that the present protein can be prepared by the recombinant DNA technology.

[Effect of the Invention]

The present invention is based on the finding of a novel protein which induces the IFN-γ production by immunocompetent cells. The present protein is generally a substance with a partially or totally revealed amino acid sequence which has a stable activity of inducing IFN-γ production by immunocompetent cells. Therefore, the present protein is widely used as an IFN-γ inducer for the IFN-γ production by the cell culture method and as a therapeutic and/or prophylactic agent in general for IFN-γ susceptive diseases such as viral diseases, malignant tumors and immunopathies.

The present protein has a strong IFN-γ inducibility so that it can induce the desired amount of IFN-γ production with only a relatively small amount. The protein dose not cause serious side effects even when administered to in a relatively large amount because of its extremely low toxicity. Therefore, the present protein has an advantage that it promptly induces the desired amount of IFN-γ production without strictly controlling the dose. The present protein has an outstanding activity of increasing the cytotoxicity of killer cells and inducing a strong

activity on the therapeutic effect and/or the reduction of side effects in the treatment of adoptive immunotherapy for malignant tumors including solid carcinomas such as lung cancer, renal cancer and breast cancer.

The present protein with these useful properties can be obtained in a desired amount by using the present DNA encoding the protein.

The present invention is a significant invention that exerts such a remarkable effect and gives a great contribution to this field.

SEQUENCE LISTING

(1)INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:
(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A)LENGTH:25 amino acids
(B)TYPE:amino acid
(D)TOPOLOGY:linear
(ii)MOLECULE TYPE:peptide
(v)FRAGMENT TYPE:internal fragment
(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:1:

```
Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile
1               5                  10                  15
Gln Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys
            20                  25
```

(2)INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:
(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A)LENGTH:18 amino acids
(B)TYPE:amino acid
(D)TOPOLOGY:linear
(ii)MOLECULE TYPE:peptide
(v)FRAGMENT TYPE:internal fragment
(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:2:

```
Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu
1               5                  10                  15
Pro Gln
```

(3)INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:
(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A)LENGTH:157 amino acids
(B)TYPE:amino acid
(D)TOPOLOGY:linear
(ii)MOLECULE TYPE:peptide
(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:3:

```
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1               5                  10                  15
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
            20                  25                  30
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
        35                  40                  45
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
    50                  55                  60
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65                  70                  75                  80
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
                85                  90                  95
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
            100                 105                 110
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
        115                 120                 125
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
    130                 135                 140
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145                 150                 155
```

(4)INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:
(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A)LENGTH:471 base pairs
(B)TYPE:nucleic acid
(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:4:

```
AACTTTGGCC GACTTCACTG TACAACCGCA GTAATACGGA ATATAAATGA CCAAGTTCTC   60
TTCGTTGACA AAAGACAGCC TGTGTTCGAG GATATGACTG ATATTGATCA AAGTGCCAGT  120
GAACCCCAGA CCAGACTGAT AATATACATG TACAAAGACA GTGAAGTAAG AGGACTGGCT  180
GTGACCCTCT CTGTGAAGGA TAGTAAAAYG TCTACCCTCT CCTGTAAGAA CAAGATCATT  240
TCCTTTGACG AAATGGATCC ACCTGAAAAT ATTGATGATA TACAAAGTGA TCTCATATTC  300
TTTCAGAAAC GTGTTCCAGG ACACAACAAG ATGGAGTTTG AATCTTCACT GTATGAAGGA  360
CACTTTCTTG CTTCCAAAA GGAAGATGAT GCTTTCAAAC TCATTCTGAA AAAAAAGGAT  420
GAAAATGGGG ATAAATCTGT AATGTTCACT CTCACTAACT TACATCAAAG T           471
```

(5)INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:
(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A)LENGTH:471 base pairs
(B)TYPE:nucleic acid
(C)strandedness:double
(D)TOPOLOGY:linear
(ii)MOLECULE TYPE:cDNA to mRNA
(vi)ORIGINAL SOURCE:
(A)ANIMAL:mouse
(ix)FEATURE:
(A)NAME/KEY:1-471 mat peptide
(xi)SEQUENCE DESCRIPTION:SEQ ID NO:5:

```
AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT    48
```

```
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1               5                  10                  15
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG   96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
            20                  25                  30
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA  144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
        35                  40                  45
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT  192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
    50                  55                  60
GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT  240
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65                  70                  75                  80
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT  288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
                85                  90                  95
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG  336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
            100                 105                 110
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA  384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
        115                 120                 125
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT  432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
    130                 135                 140
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT              471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145                 150                 155
```

[Brief Description of the Accompanying Drawings]

FIG. 1 is an elution pattern on HPLC of peptide fragments obtained by the trypsinization of the present protein.

FIG. 2 is a structure of pMGTG-1, i.e. a recombinant DNA according to the present invention.

[Explanation of the symbols]

MGTG-1 cDNA : cDNA which encodes the present protein

Ptac : tac promoter

GST : glutathione S transferase gene

AmpR : ampicillin resistant gene

ori : replication initiation site of *Escherichia coli*

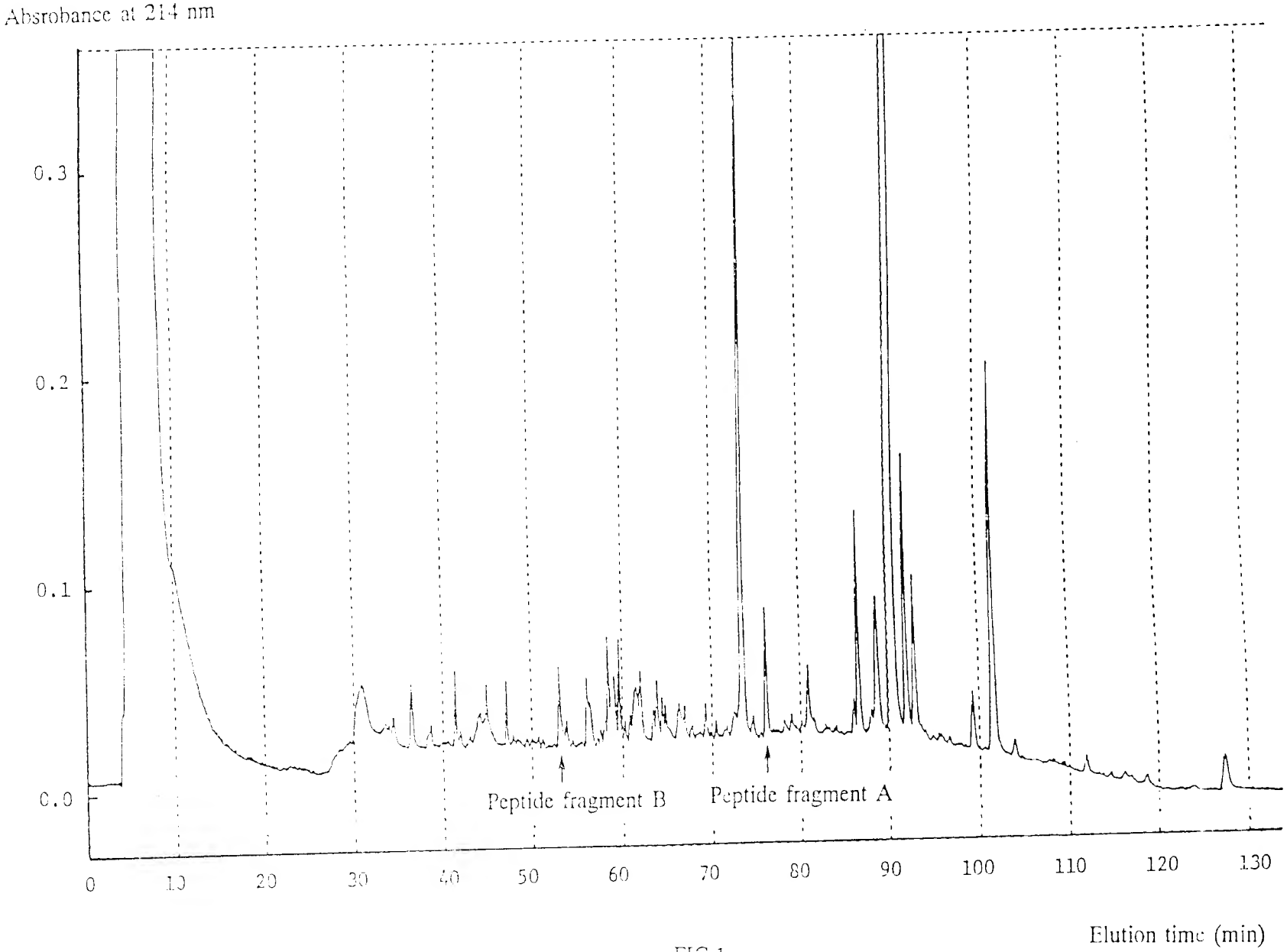

Absrobance at 214 nm
0.3
0.2
0.1
0.0
Peptide fragment B
Peptide fragment A
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
Elution time (min)

FIG.1

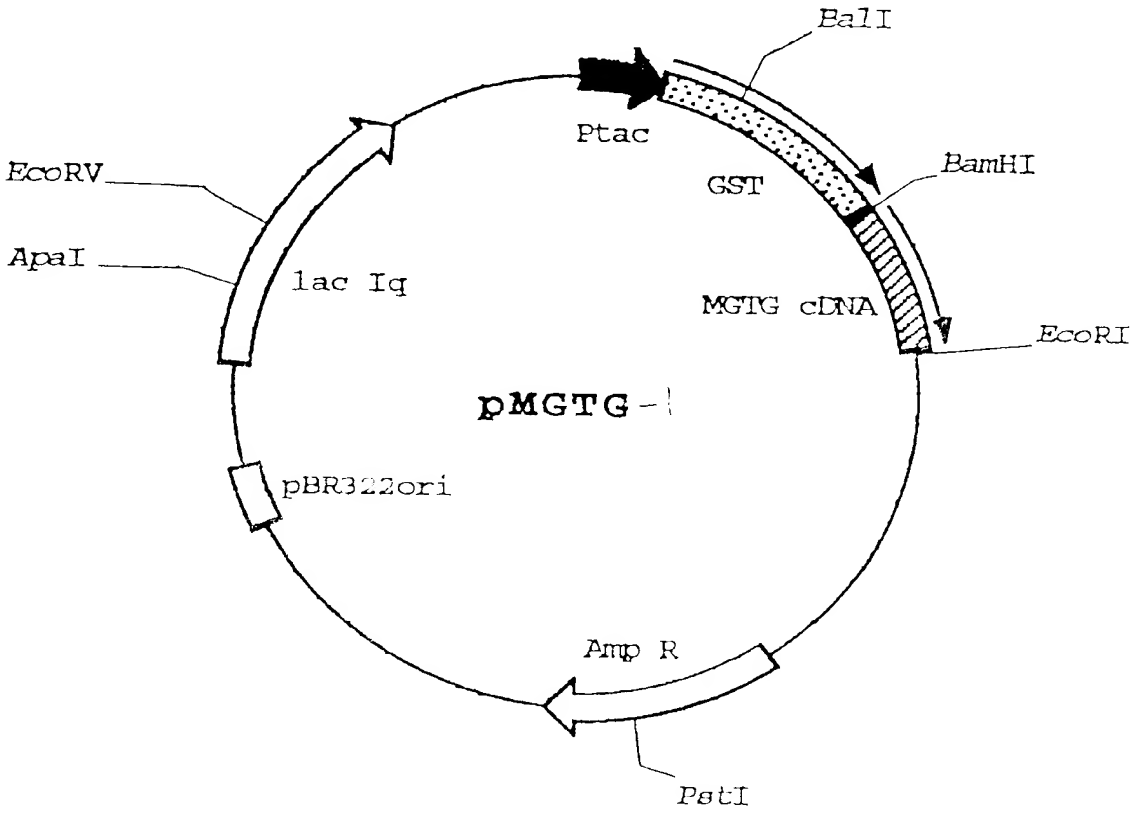

BalI
Ptac
BamHI
GST
EcoRV
ApaI
lac Iq
MGTG cDNA
EcoRI
pMGTG-1
pBR322ori
Amp R
PstI

FIG.2